DIE KLINISCHE BEDEUTUNG DES CARCINOEMBRYONALEN ANTIGENS

Erfahrungen mit einem neuen Radioimmunoassay

Hermann Ruider

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0006

Aus der Medizinischen Klinik II Klinikum Grosshadern
der Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. H. J. Karl

DIE KLINISCHE BEDEUTUNG DES CARCINOEMBRYONALEN ANTIGENS

Erfahrungen mit einem neuen Radioimmunoassay

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Hermann Ruider
aus München

München 1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. R.Lamerz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J.J.Karl

Dekan: Prof. Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.6.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1	EINLEITUNG	3
2	ABRISS DER BISHERIGEN FORSCHUNGSERGEBNISSE ÜBER CEA	5
2.1	Vorkommen von CEA	5
2.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften	6
2.3	Kreuzreagierende Substanzen	6
2.4	Nachweismethoden	7
3	METHODIK	8
3.1	Analytische Verfahren	8
3.1.1	CAF-Elektrophorese und Eiweißbestimmung	8
3.1.2	Immunelektrophorese	8
3.1.3	Zweidimensionale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY	8
3.1.4	Radioimmunoassay	9
3.1.4.1	Prinzip	9
3.1.4.2	Durchführung	10
3.1.4.2.1	Markierung	10
3.1.4.2.2	Antikörperverdünnungskurve	12
3.1.4.2.3	Durchführung des Radioimmunoassays	13
3.2	Präparative Verfahren	15
3.2.1	Gewebe-Extraktion	15
3.2.2	Säulenchromatographie	16
3.2.2.1	Gelfiltration	16
3.2.2.2	Ionenaustausch-Chromatographie mit DEAE-Zellulose	18
3.2.2.3	Affinitätschromatographie	18
3.2.3	Zentrifugation	19
3.2.4	Dialyse	20
3.2.5	Einengung	20
3.2.6	Lyophilisation	21

3.3	Herstellung von Antiseren	22
3.3.1	Immunisierung	22
3.3.2	Absorption und Reinigung der Antiseren	23
3.3.3	Prüfung von Spezifität und Reinheit des Antiserums	23
3.4	Berechnungen	24
3.4.1	Markierung	24
3.4.2	Antikörperverdünnungskurve und RIA	24
3.4.3	Statistische Berechnungen	25
4	MATERIALIEN UND PATIENTENGUT	26
4.1	Materialien	
4.1.1	Zur Extraktion verwandte Gewebe	26
4.1.2	Antiseren	28
4.1.3	Vergleichs-RIA	28
4.1.4	RIA-Standard	28
4.2	Patientengut	28
4.2.1	Normalkollektiv	29
4.2.2	Patienten mit malignen Erkrankungen	29
4.2.2.1	Dickdarmkarzinom	29
4.2.2.2	Mammakarzinom	29
4.2.2.3	Andere maligne Erkrankungen	30
4.2.3	Patienten mit nicht malignen Erkrankungen	31
4.2.4	Schwangere und Neugeborene	31
5	ERGEBNISSE	32
5.1	Methodischer Teil	32
5.1.1	Gewebeextraktion	32
5.1.2	Reinigung des Antigens	36
5.1.3	Herstellung von Antiseren	39
5.1.4	RIA	45
5.1.4.1	Markierung	45
5.1.4.2	Antikörperverdünnungskurve	48
5.1.4.3	Standardkurve	48
5.1.4.4	Spezifität, Qualitätskontrolle und Haltbarkeit	51
5.1.4.5	Vergleich zwischen direktem und indirektem Test	53

5.1.4.6	Vergleich mit kommerziellen Testen	53
5.2	Klinischer Teil	56
5.2.1	CEA-Spiegel bei Normalpersonen	56
5.2.2	CEA-Spiegel bei Patienten mit malignen Erkrankungen	56
5.2.2.1	Dickdarmkarzinom	56
5.2.2.2	Mammakarzinom	60
5.2.2.3	Blasentumoren	63
5.2.2.4	Andere Karzinome	65
5.2.3	CEA-Spiegel bei Patienten mit nicht malignen Erkrankungen	65
5.2.4	CEA-Spiegel bei Schwangeren und Neugeborenen	68
6	DISKUSSION	70
6.1	Methodischer Teil	70
6.1.1	Gewebe-Extraktion und Reinigung des Antigens	70
6.1.2	Herstellung der Antiseren	74
6.1.3	RIA	77
6.1.3.1	Markierung	77
6.1.3.2	Antikörperverdünnungskurve	80
6.1.3.3	Standardinhibitionskurve und Testansatz	80
6.1.3.4	Vergleich zwischen verschiedenen CEA-Assays	85
6.2	Klinischer Teil	87
6.2.1	Normalwerte	87
6.2.2	Maligne Erkrankungen	88
6.2.2.1	Dickdarmkarzinom	88
6.2.2.2	Mammakarzinom	95
6.2.2.3	Andere maligne Erkrankungen	97
6.2.3	Nicht maligne Erkrankungen	99
6.2.4	Schwangere und Neugeborene	101
7	ZUSAMMENFASSUNG	102
8	LITERATURVERZEICHNIS	
9	LEBENSLAUF	

1. EINLEITUNG

Grundlage der Tumorimmunologie ist die Vorstellung, daß sich auf der Tumorzelle Antigene befinden, die auf normalen Zellen nicht vorkommen. Während derartige tumorspezifische Antigene bei vielen experimentellen Tiertumoren gefunden wurden, ließen sie sich bei menschlichen Tumoren bisher nicht mit Sicherheit nachweisen. Es wurden jedoch einige tumorassoziierte Antigene entdeckt, d.h. Antigene, die vorwiegend bei Tumoren vorkommen, ohne tumorspezifisch zu sein. Dazu gehört auch die Gruppe der karzinofetalen Antigene, die normalerweise in fetalen Geweben enthalten sind, nach der Geburt ganz oder großenteils verschwinden und später wieder in bestimmten Tumoren gebildet werden, möglicherweise durch eine Derepression reprimierter Gene. Eine derartige Beziehung zwischen Tumor- und Embryonalgewebe wurde bereits 1929 bzw. 1932 von HIRSZFELD vermutet (78, 79). Dieser Gedanke rückte aber erst in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, als ABELEV 1963 (1) bei Mäusen mit transplantierbaren Hepatomen und TATARINOV 1964 (173) bei Patienten mit primären Leberzellkarzinomen das bis dahin nur als fetales Antigen bekannte Alpha-Fetoprotein (AFP) nachweisen konnten. (Ausführliche Darstellungen über AFP: LAMERZ et al. [101] und SCHMALHORST [161]) In der Folgezeit wurde intensiv nach ähnlichen Antigenen gesucht (Übersicht bei LAMERZ [103]) und neben einigen anderen wie z. B. dem Regan-Isoenzym (FISHMAN et al. [44]), dem Gamma - Fetoprotein (EDYNAK et al. [37]) und dem fetalen Sulfoglykoprotein-Antigen (HÄKKINEN et al. [59, 60, 61]) 1965 von GOLD et al. (50, 51) in Dickdarmkarzinomen das carcino-embryonale Antigen (CEA) entdeckt. Als 1969 dieselbe Arbeitsgruppe über erste Ergebnisse mit einem CEA- Radioimmunoassay berichtete (177), wobei 35 von 36 Patienten

mit Dickdarmkarzinomen, aber keine klinisch gesunden Personen im Serum CEA-Spiegel über 2,5 ng/ml aufwiesen, schien ein einfacher "Krebstest" gefunden. In weiteren Untersuchungen wurden diese hochgespannten Hoffnungen jedoch enttäuscht.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

1. Die Isolierung von CEA aus Dickdarmkarzinomen
2. Die Gewinnung eines monospezifischen Anti-CEA-Serums
3. Die Entwicklung eines eigenen CEA-Radioimmunoassays
4. Die Bestimmung des CEA-Spiegels bei Normalpersonen, bei Schwangeren und Neugeborenen sowie bei Patienten mit malignen und nicht malignen Erkrankungen.
5. Die Durchführung von Verlaufsbestimmungen bei Patienten mit Dickdarmkarzinomen und bei Patientinnen mit Mammakarzinomen nach chirurgischer bzw. unter zytostatischer Therapie.
6. Die Beurteilung der Wertigkeit des CEA-Testes für die Diagnostik und Therapiekontrolle maligner Erkrankungen aufgrund der eigenen Ergebnisse unter Berücksichtigung anderer Untersuchungen.

2. ABRISS DER BISHERIGEN FORSCHUNGSERGEBNISSE ÜBER CEA

2. 1 Vorkommen von CEA

GOLD und Mitarbeiter fanden 1965 das carcino-embryonale Antigen (CEA) in Adenokarzinomen des Dickdarms (50, 51). Sie konnten es mit der Ouchterlony-Doppeldiffusion nur in Extrakten aus Tumoren des Gastrointestinaltrakts und aus fetalem Darm-, Leber- und Pankreasgewebe nachweisen, nicht aber in anderen Tumoren oder in normaler Schleimhaut. KHOO et al. (86) führten in Extrakten verschiedener Gewebe quantitative radioimmunologische Bestimmungen durch und ermittelten die höchsten CEA-Konzentrationen in Tumoren des Gastrointestinaltrakts und ihren Metastasen. Mit dieser empfindlicheren Methode war CEA jedoch auch in anderen Tumoren und in normaler Dickdarm- und Magenschleimhaut in Konzentrationen von 17-156 ng bzw. von 28-86 ng/g Feuchtgewicht nachweisbar. CEA wurde außerdem im Mekonium (47, 77, 156), im Stuhl (2, 41, 77), im Urin (26, 62, 138, 189), im Pankreassaft (111, 163), sowie in Zellkulturen von menschlichen Tumoren (11, 12, 39, 56) gefunden. Klinische Bedeutung erlangte das CEA, nachdem 1969 durch den Radioimmunoassay von THOMSON et al. (177) CEA auch im Blut Krebskranker nachgewiesen werden konnte.

Mit immunfluoreszenzoptischen Methoden konnten v. KLEIST et al. (90, 91) das CEA auf der lumenwärts gerichteten Oberfläche von malignen Schleimhautzellen lokalisieren. Über ähnliche Ergebnisse berichteten DENK et al. (31). Sie halten CEA deshalb für ein Sekretionsprodukt, während es sich nach der Meinung von ROSAI et al. (154) bei CEA um einen Zellbestandteil handelt.

2. 2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

CEA ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 150000 und 200000 D (21, 98, 175). Es ist relativ hitzestabil und in 1 M Perchlorsäure löslich. Der Sedimentationskoeffizient liegt nach KRUPEY et al. (98) zwischen 6,9 und 8,0 S, nach COLIGAN et al. (21) und PLOW et al. (144) bei 6,8 S. In der Elektrophorese zeigt CEA Beta-Mobilität. TERRY und Mitarbeiter bestimmten einen Kohlenhydratanteil von 50-75%, entsprechend einem Proteinanteil von 25-50% (174, 175). Dieselbe Arbeitsgruppe ermittelte folgende N-terminale Aminosäurensequenz: Lys-Leu-Thr-Ile-Glu-Ser-Thr-Pro-Phe-Asn-Val-Ala-Glu-Gly-Lys-Glu-Val-Leu-Leu-Val-His-Asn-Leu. Mehrere Untersucher wiesen eine Heterogenität von CEA nach: Durch Isoelektrofokussierung oder durch Chromatographie mit ECTEOLA-Zellulose konnte CEA in physikalisch-chemisch, nicht aber immunologisch unterscheidbare Fraktionen getrennt werden (6, 22, 42, 54, 157, 182, 184).

2. 3 Kreuzreagierende Substanzen

MACH et al. (119, 147), v. KLEIST et al. (92, 93, 94) und verschiedene andere Untersucher (13, 138, 179, 182) fanden in Dickdarmtumoren und in verschiedenen anderen menschlichen Geweben ein niedermolekulares Glykoprotein, das mit dem CEA eine Kreuzreaktion zeigte. Es wurde als nonspecitic cross-reacting antigen (NCA), als normal glycoprotein (NGP) bzw. als colon carcinoma antigen III bezeichnet. Es hat nach TOMITA et al. (179) eine Antigendeterminante mit CEA gemeinsam. Sein Molekulargewicht wird mit etwa 50000 D angegeben. KLEIST et al. (95) sowie NEWMAN et al. (139) konnten es in Konzentrationen von ca. 1 µg/ml im menschlichen Serum nachweisen.

Eine enge Beziehung scheint auch zwischen CEA und den Blutgruppensubstanzen zu bestehen. SIMMONS und PERL-

MANN (165) halten CEA für eine inkomplette Blutgruppensubstanz. Während GOLD (53) und TURNER (184) eine gemeinsame Antigendeterminante im CEA-Molekül und auf der Blutgruppensubstanz A vermuten, erklären LO GERFO (114) und COOPER (27) die Kreuzreaktion durch eine Verunreinigung der CEA-Präparation mit A-Substanz.

2. 4 Nachweismethoden

Zum Nachweis von CEA im Serum wurde mit wenigen Ausnahmen (63, 107) der hochempfindliche Radioimmunoassay verwandt, da die CEA-Konzentrationen selbst unter pathologischen Bedingungen meist im unteren ng/ml-Bereich liegen.

Einzelheiten der einzelnen RIA-Systeme werden wie die Reinigungsmethoden und die klinische Bedeutung von CEA im Abschnitt "Diskussion" besprochen.

3. METHODIK

3. 1 Analytische Verfahren

3. 1.1 CAF-Elektrophorese und Eiweißbestimmung

Die Elektrophorese wurde auf 25,5 x 14,5 mm großen Celluloseacetatfolien [1] in der Mikrophorkammer [2] durchgeführt. Die Spannung betrug 250 V, die Stromstärke 10mA/cm und die Laufzeit 60 min. Die Folien wurden mit Amidoschwarz 10B gefärbt und mit einem Extinktions-Integralschreiber [3] ausgewertet. Das Gesamteiweiß wurde mit der Biuretmethode von WEICHSELBAUM (188) bestimmt.

3. 1.2 Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde nach der Methode von GRABAR und WILLIAMS (58) in der Mikromodifikation nach SCHEIDEGGER (160) auf Objektträgern in der Universalelektrophoresekammer [4] durchgeführt. Die Spannung betrug 200 V bei einer Stromstärke von 25mA, die Laufzeit 60 min. Als Gel wurde 2%iger Reinagar in 1:2 verdünntem Veronal-Na-Na-Acetatpuffer (pH 8,6), zur Färbung Azokarmin in einer Eisessig-Methanollösung (1:10) verwendet.

3. 1.3 Zweidimensionale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (142)

Prinzip:

Bei der Doppeldiffusion handelt es sich um eine immunolo-

---

1 Fa. SARTORIUS, Göttingen
2 Fa. BOSKAMP, Hersel
3 Fa. C. ZEISS KG, Oberkochen
4 Fa. CAMAG, Muttenz (Schweiz)

gische Nachweismethode, bei der man Untersuchungsmaterial (Antigene bzw. Antikörper) in einer Gelmatrix gegen verschiedene Referenzsubstanzen diffundieren läßt. Dadurch werden Antigen-Antikörperreaktionen als fixe Präzipitationslinien im Gel sichtbar. Diese Methode wurde vor allem zur Prüfung der Reinheit von Antigen- und Antikörperpräparationen eingesetzt.

Durchführung:

Objektträger wurden mit erhitztem Difcoagar [1] beschichtet. Nach Abkühlung wurden mit einer Stanze ein zentrales Reservoir (2 bzw. 4 mm Ø) und darum in einer rosettenförmigen Anordnung 6-8 weitere Reservoirs ausgestanzt und mittels einer Mikropipette [2] mit entsprechenden Lösungen beschickt. Nach einer Diffusionszeit von 24-48 Stunden wurden die Präparate in 0,9%iger NaCl-Lösung gewässert (24 Std.), getrocknet, mit Azokarmin gefärbt und mit Methanol-Eisessig (1:10) entfärbt.

3. 1.4 Radioimmunoassay

3. 1.4.1 Prinzip

Der Radioimmunoassay ist die empfindlichste immunologische Nachweismethode. Im Testansatz werden definierte Volumina einer Proben- oder Standardlösung, eines radioaktiv markierten Antigens und des homologen Antikörpers zusammengegeben. Nicht markiertes (Proben- bzw. Standard-) und markiertes Antigen konkurrieren um eine begrenzte Anzahl freier Antikörper. Die entstehenden Immunkomplexe werden entweder durch einen 2. Antikörper, der gegen die Immunglobuline der Spezies gerichtet ist, von der der 1. Antikörper stammt, oder durch andere Methoden (Ammoniumsulfat, Polyäthylenglycol, Zirconylphosphat u.a.) präzipitiert bzw. ausgefällt. Nach Zentrifugation werden sie dann vom Über-

stand getrennt und im Gamma-Zähler gemessen. Je mehr Antigen die Proben- bzw. die Standardlösung enthält, desto weniger markiertes Antigen wird vom Antikörper gebunden und desto weniger Radioaktivität im Präzipitat gemessen. Über eine Standardkurve aus den Meßwerten mehrerer Standards wird die Antigenkonzentration der Probe ermittelt.

3. 1.4.2 Durchführung

3. 1.4.2.1 Markierung

Die Markierung von gereinigtem CEA wurde mit radioaktivem ^{125}I nach der Methode von HUNTER (82) vorgenommen. Prinzip: Mit Chloramin T als Oxidationsmittel wird das ^{125}I - als NaI vorliegend-aktiviert und vorwiegend an die Tyrosingruppen des zu markierenden Proteins gebunden. Durch Zusatz des Reduktionsmittels Na-Di-Sulfit wird diese Reaktion nach einer kurzen Reaktionszeit sofort unterbrochen. Hierbei sind die Mengen von Chloramin T, an Na-Di-Sulfit und an Radioaktivität möglichst niedrig zu halten, um das Protein nicht zu schädigen und die immunologische Reaktionsfähigkeit nicht zu beeinträchtigen.

Vorgehen: Vor der Markierung wurde die Na-^{125}I-Lösung [3] (Aktivität 1 mCi) im Versandgefäß mit 70 µl 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7,5) verdünnt. Darauf wurden nacheinander mit Eppendorfpipetten [4] folgende Substanzen in ein 1 ml-Kunststoffreagenzgefäß [4] gegeben:

20 µl CEA Lösung, enthaltend 8 µg CEA, gelöst in 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7,5)
10 µl 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7,5)

---

1 Fa. DIFCO Lab., Detroit, USA
2 Fa. DADE DIAGNOSTICS, Miami, USA
3 Fa. HÖCHST AG, Frankfurt
4 Fa. EPPENDORF, Hamburg

20 µl Na-^{125}I-Lösung mit 0,3 mCi
Chloramin T-Lösung, enthaltend 50 µg Chloramin T, gelöst in 0,05 M Phosphatp. (pH 7,5) (frisch angesetzt)

Nach vorsichtigem Mischen auf einem Spezialschüttler [1] und einer Inkubation von 25 sec wurden zugegeben:

25 µl Na-Disulfitlösung, enthaltend 12 µg Na-Disulfit gelöst in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,5)

Nach sofortigem Mischen Zugabe von:

200 µl 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,5) mit 2% Serumalbumin vom Rind (BSA)

Dieses Gemisch wurde zur Trennung von nicht gebundenem ^{125}I auf einer Sephadex G 50-Säule (1 x 15 cm) chromatographiert, die zuvor mit 1 ml Veronalpuffer (mit 2,5% BSA) vorbehandelt war, um eine Adsorption von markiertem Protein zu vermeiden. Eluiert wurde mit 0,07 M Veronalpuffer (pH 8,6). Das Eluat wurde mittels eines Fraktionskollektors [2] in 1 ml-Fraktionen in kleinen Eppendorfgefäßen gesammelt, in die 0,2 ml Veronalpuffer mit 2,5% BSA vorgegeben waren. Die Radioaktivität der einzelnen Gefäße einschließlich der zum Auftrag benutzten Pipettenspitze und des leeren Reaktionsgefäßes wurde in einem relativ unempfindlichen Gammazähler [3] gemessen, die Fraktionen mit der höchsten Aktivität auf einer Sephadex G 200-Säule rechromatographiert, wieder mit obigem Puffer eluiert und in 1 ml-Portionen gesammelt. Die gemessene Radioaktivität der Fraktionen wurde in ein Diagramm eingezeichnet, an Hand dessen der Inhalt mehrerer Röhrchen zu Sammelfraktionen gepoolt wurde. Diese wurden mit unserem RIA-Verdünnungspuffer (0,01 M Phosphatpuffer + 0,15 M NaCl + 1% BSA + 0,4% EDTA-Titriplex,

---

1 Fa. EPPENDORF, Hamburg
2 Fa. LKB, Bromma Schweden
3 Fa. TELEFUNKEN
4 WALLAC 80000 Gamma Sample counter, Fa. LKB

pH 8,2) soweit verdünnt, daß in 100 µl mit einem empfindlichen RIA-Gammazähler [4] etwa 20000 counts/min gemessen wurden, und in 10 ml Portionen bei -40°C eingefroren.

3. 1.4.2.2 Antikörperverdünnungskurve

Prinzip: Bei der Antikörperverdünnungskurve werden einer geometrischen Verdünnungsreihe des 1. Antikörpers jeweils gleiche Mengen an markiertem Antigen zugesetzt und nach Inkubation, Zugabe des 2. Antikörpers, erneuter Inkubation und Zentrifugation die gebundene Radioaktivität gemessen, um die für den Test günstigste Verdünnung des 1. Antikörpers zu ermitteln, die in der Regel zu einer Bindung von 30-50% der zugeführten Gesamtaktivität führt. Der N-Wert gibt die unspezifische Bindung an, d.h., wieviel Radioaktivität durch Adsorption an die Gefäßwand, durch den 2. Antikörper oder durch Fällungsvorgänge gebunden wird.

Durchführung: Folgende Substanzen wurden in je 2 Polystyrolröhrchen (12 x 55 mm) [1] zusammengegeben:

Röhrchen A: Totals	100 µl CEA* (^{125}I-CEA) = 20000 Counts
Röhrchen B: N-Wert	100 µl CEA*
	400 µl RIA-Puffer
Röhrchen C_1-C_{11} Antikörperverdünnungsreihe	100 µl CEA*
	200 µl RIA-Puffer
	100 µl 1. Antikörper (Anti-CEA-Serum vom Kaninchen) in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:102400

Nach gründlichem Mischen mit einem VORTEX-Genie-Schüttler [2] und einer Inkubation von 24 Stunden wurden zu Röhrchen B und C zugegeben:

---

1 Fa. BOLL, München
2 Fa. BENDER & HOBEIN, München
3 Fa. BEHRINGWERKE, Marburg

100 µl 2. Antikörper (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin von der Ziege [3], 1:10 mit RIA-Puffer verdünnt.

Nach einer erneuten Inkubation von 24 Stunden wurden die Röhrchen B und C für 30 min bei 1000 g zentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes zum Abtropfen umgekehrt auf einen saugfähigen Karton gestellt. Verbleibende Flüssigkeitstropfen wurden mit Filterpapier sorgfältig ausgewischt, ohne das Präzipitat zu berühren. Danach wurde die Radioaktivität der Röhrchen im Gammazähler über 60 sec gemessen.

3. 1.4.2.3 Durchführung des Radioimmunoassays

Der CEA-Test wurde als direkter Test mit unbehandelten Patientenseren (oder sonstigen Proben) und als indirekter Test mit perchlorsäure-extrahierten Seren durchgeführt. Diese wurden auf folgende Weise gewonnen: Als Doppelbestimmung wurden 2 x 0,5 ml Patientenserum mit jeweils 0,5 ml gekühlter 1,2 M Perchlorsäure vermischt und nach Inkubation über 20 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Dialyseschläuche gefüllt und ausgiebig dialysiert (s. S. 20), gegen 0,01 M Phosphatpuffer (pH 8,0) äquilibriert, in Plastikröhrchen umgefüllt und 10 min zentrifugiert (1000 g). Zum CEA-Test wurde der Überstand verwandt.

Als Standard diente eine CEA-Präparation, die an einem kommerziellen Standard (CEA-ROCHE-Test) geeicht war, in einer geometrischen Standardverdünnungsreihe zwischen 160 und 1,25 ng/ml.

Der Testansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert: (jeweils Doppelbestimmungen)

1. Direkter Test

Totals und N-Wert wie oben (S.12)

Standardkurve:

100 µl RIA-Puffer
+200 µl getestetes CEA-freies Humanserum
+100 µl Standardlösung mit 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5 und 1.25 ng/ml bzw. 0 ng/ml als Leerwert
+100 µl 1. Antikörper (verdünnt in RIA-Puffer)

Analysenproben:

200 µl RIA-Puffer
+200 µl Probe (meist Serum)
+100 µl 1. Antikörper

Nach gründlichem Mischen und einer Vorinkubation von 6 Std. bei 37° C wurden in jedes Röhrchen gegeben:

100 µl CEA*

Nach erneutem Mischen und einer Inkubation von 24 Stunden bei Zimmertemparatur wurden zugegeben (außer Totals u. N-Wert)

100 µl 2. Antikörper (1:15 in RIA-Puffer verdünnt)

Danach wurde verfahren wie bei der Antikörperverdünnungskurve.

2. Indirekter Test

Totals und N-Wert wie oben
Standardkurve:

500 µl Phosphatpuffer (0.01 M, pH 8,0) + 3 % Pferdeserum
+100 µl Standardlösung (wie dir. Test)
+100 µl 1. Antikörper

Analysenproben:

500 µl Perchlorsäureextrakt
+100 µl RIA-Puffer
+100 µl 1. Antikörper

Weiteres Vorgehen wie beim direkten Test.

Für Urin- und Fruchtwasseruntersuchungen wurde das Pipettierschema des indirketen Testes modifiziert. Statt 500 µl Perchlorsäureextrakt wurden 100 µl Fruchtwasser bzw. 100 µl gegen 0,01 M Phosphatpuffer (pH 8,0) äquilibrierter Urin pipettiert, dafür statt 100 µl RIA-Puffer 500 µl.

Um die Reproduzierbarkeit des Testes zu gewährleisten, wurden in jeden Testansatz 4 Kontrollseren in verschiedenen Konzentrationsbereichen aufgenommen. Zum Vergleich verschiedener CEA-RIA-Methoden wurden 211 Seren sowohl mit dem direkten als auch mit dem indirekten Test untersucht, 81 Seren mit dem eigenen (indirekter T.) Assay und dem der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE sowie 142 Seren mit dem eigenen (dir. T.) und dem der Fa. IDW.

3. 2 Präparative Verfahren

3. 2.1 Gewebe-Extraktion

Die Gewebe-Extraktion wurde mit geringen Modifikationen nach den Angaben von KRUPEY et al. (97, 99) vorgenommen.

Die einzelnen Tumor- bzw. Normalgewebsproben wurden innerhalb von 3 Stunden nach Entnahme sauber präpariert und bei -70° C eingefroren. Für eine Tumorextraktion wurden ungefähr 500 bis 1000 g Gewebe gepoolt, entsprechend ungefähr 25 Tumoren.

Nach dem Auftauen wurden die Gewebsproben zuerst mit einer Schere in kleine Teile zerschnitten, dann mit einem Wiegemesser kleingehackt. In kleinen Portionen wurden sie dann für 3 min unter Zugabe des gleichen Volumens an destilliertem Wasser (mit Zusatz von 0,1% Cialit) im Braun-Multimix [1] weiterverarbeitet. Der dabei entstandene rosa bis bräunlich gefärbte Gewebebrei wurde in 400 ml-Portionen bei 4° C in einem VIRTIS "60" Homogenisator [2] durch rhomboide Schermesser bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 15000 Upm während einer Stunde homogenisiert. Die abschließende feinste Zerkleinerung wurde mit einem Homogenisator [1] nach POTTER-ELVEHJEM (145) durchgeführt. Dabei wurde in einem

mit Gewebebrei gefüllten 60 ml-Glaszylinder ein sich schnell drehender, relativ dicht abschließender, teflonbeschichteter Pistill 3 - 4 x auf- und abbewegt, sodaß der Gewebebrei zwischen Glas und Pistill durchgepreßt und dabei zerquetscht wurde. Für diesen Arbeitsgang war es nötig, nochmals etwa 1 Liter destilliertes Wasser zuzugeben.

Zu der entstandenen Suspension wurde das gleiche Volumen an 1,2 M Perchlorsäure zugegeben und die Mischung auf einem Magnetrührer 30 min lang verrührt. Nach 30- minütigem Zentrifugieren in 200 ml - Gläsern wurde der Überstand gesammelt, während das Präzipitat demselben Verfahren nochmals unterworfen wurde (Pottern etc.). Das dabei enstandene Präzipitat wurde verworfen. Das in den Zentrifugengläsern oben schwimmende Fett wurde möglichst sorgfältig abgeschöpft, der Rest durch eine Papierfiltration (Blauband Nr. 589[3])[3] entfernt. Der gesammelte Überstand wurde in KALLE-Dialyseschläuche [4] abgefüllt (s. S.20) und 48 Stunden gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Wie auf S.20 ausführlich beschrieben, wurde er dann in einem Amiconsystem eingeengt und durch Nachspülen mit destilliertem Wasser nochmals entsalzt. Das Konzentrat mit einem Endvolumen von 60 bis 80 ml wurde aus der Kammer abgesaugt und eine Stunde lang mit 10000 g zentrifugiert (s. S.19). Der Überstand wurde durch ein Bakterienfilter (Druckfiltrationsgerät SM 16223 [5]) mit Glasfaservorfilter und Filtern der Stärken 3,0; 1,2; 0,6 und 0,2 u gepreßt und danach lyophilisiert (s. S.21).

3. 2.2. Säulenchromatographie

3. 2.2.1 Gelfiltration

Durch Gelfiltration mit Sephadex G [6] und Sepharose [6] ist es möglich, Proteingemische nach der Molekülgröße aufzutrennen. Je nach Teilchengröße und Vernetzungsgrad zeigen die verschie-

---

1 Fa. BRAUN, Melsungen
2 Fa. CENCO, Haan
3 Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL,
4 Fa. KALLE, Wiesbaden
5 Fa. SARTORIUS, Göttingen
6 Fa. PHARMACIA, Uppsala

denen Sepharose- und Sephadextypen ihre besten Trennergebnisse bei unterschiedlichen Molekulargewichten der zu trennenden Substanz.

Bei Sepharose 6 B handelt es sich um ein Agarose-Gel, dessen perlförmige Partikel eine Größe von 60 - 210 µ aufweisen und das die besten Trennergebnisse im höhermolekularen Bereich zeigt. Sepharose 6 B wurde zur primären Auftrennung des Dickdarmtumorextraktes (TE) verwandt unter folgenden Versuchsbedingungen:

Säulengröße:	2 x 110 cm
Elutionspuffer:	Na-Phosphatpuffer 0,02 M in 0,9% Na-Cl mit 0,02% NaN_3 (pH 5,5)
Auftrag:	130 mg TE, gelöst in 2,5 ml Elutionspuffer
Flow rate:	24 ml/min
Filtrationsdruck:	20 cm H_2O

Sephadex G 200 ist ein kugelförmiges, polymerisiertes Dextran mit einem Fraktionierbereich zwischen MG 5000 und 800000. Es wurde vor allem für den zweiten TE-Reinigungsschritt verwandt in Säulen von 2 x 80 cm (Elutionspuffer Tris-HCl 0,05 M, pH 6,0 in 0,1 M NaCl mit 0,02% NaN_3). Außerdem diente es in einer Säule von 1,5 x 35 cm zur Endreinigung des markierten CEA (Elutionspuffer: 0,07 M Veronalpuffer, pH 8,6).

Sephadex G 50 fine, das vorwiegend im Molekulargewichtsbereich zwischen 1500 und 30000 trennt, wurde zur Reinigung des markierten CEA von nicht gebundenem ^{125}I eingesetzt (Säulengröße 1 x 15 cm, Elutionspuffer: 0,07 M Veronalpuffer).

Sephadex G 25 wurde zur Entsalzung von kleineren Proteinmengen vor der Lyophilisation verwandt (Säulengröße 1 x 15 cm, Elution mit aqua dest.).

Bei Vorbereitung und Gießen der Säulen wurde nach den Vorschriften des Herstellers verfahren. Die Elution erfolgte unter kontinuierlicher Absorptionsmessung bei 280 bzw. 254 nm [1], das Eluat wurde bei den großen Säulen durch einen automatischen Fraktionskollektor [2] in 6 ml - Portionen gesammelt.

3. 2.2.2 Jonenaustausch-Chromatographie mit DEAE-Zellulose

Bei der DEAE-Zellulose[3] handelt es sich um einen Jonenaustauscher, durch den Proteine je nach ihrem Ladungszustand und dem verwendeten Puffersystem chromatographisch eluiert oder zurückgehalten werden.

Die Zellulose wurde (nach den Angaben von KNEDEL und Mitarbeiter 96) zuerst mit 0,1 M NaOH, dann mit 0,1 M HCl vermischt, dazwischen und danach mit aqua dest. annähernd bis zum Neutralpunkt gewaschen, anschließend gegen den Startpuffer (0,01 M NaP-Puffer, pH 8,0) äquilibriert und mit langsam steigendem Druck bis 0,5 kp/cm^2 (Druckluft) in eine 2,5 x 100 cm große Säule bis zu einer Höhe von durchschnittlich 70 cm gepackt. Darauf wurden 20 - 40 ml vollabsorbiertes Anti-CEA-Kaninchenserum aufgetragen und mit Hilfe einer Schlauchpumpe[4] kontinuierlich mit Startpuffer eluiert (6 ml-Fraktionen, 20 - 30 ml/min). Nach Erscheinen des 1. Hauptpeaks wurde der Grenzpuffer (0,5 M Na-Phosphatpuffer, pH 4,5) so an den Startpuffer angeschlossen, daß durch einen kontinuierlichen, konvexen Molaritätsgradienten nach und nach alle Proteine eluiert wurden. (Fraktionssammlung und Absorptionsmessung s.o.)

3. 2.2.3 Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie mit cyanobromidaktivierter Sepharose[5] koppelt man über kovalente Bindungen spezifische Antikörper an das Sepharose-Gel. Gibt man dann ein Substanzengemisch über eine derartige Säule, das das entsprechende Antigen enthält, so wird nur dieses Antigen in der Säule immunologisch gebunden. Sind alle nicht gebundenen Verunreinigungen eluiert, so kann man z. B. mit einem pH-Wechsel ins saure Milieu die Antigen-Antikörperbindung

---

1 Uvicord I bzw. II, Fa. LKB Schweden
2 Ultrorac, Fa. LKB
3 Fa. SERVA, Heidelberg
4 Vario-Perpex-Schlauchpumpe, Fa. LKB
5 Fa. PHARMACIA, Uppsala

lösen und das reine Antigen eluieren. Diese Methode wurde als dritter und letzter Reinigungsschritt für die Isolierung von CEA gewählt.

Durchführung: Zuerst wurden 10 g CnBr-aktivierte Sepharose für 15 min in 2 l 0,001 M HCl gewaschen, dann die Flüssigkeit auf einer Fritte bis auf 100 ml abgesaugt. Dieser Rest wurde zu einer Lösung von 100 mg Anti-CEA-Immunglobulin in 300 ml $NaHCO_3$ -Puffer (0,1 M in 0,5 M NaCl, pH 8,3) gegeben und 2 Stunden lang durch Über-Kopf-Rotation in Suspension gehalten. Der nicht gebundene Antikörper wurde zusammen mit der überschüssigen, gelfreien Flüssigkeit auf einer Fritte abgesaugt. Nach Blockierung der restlichen reaktiven CnBr-Gruppen mit 1 M Äthanolamin oder mit 1 M Glycin und 3 Waschzyklen mit Acetatpuffer (0,1 M in 1 M NaCl, pH 4,0) und Boratpuffer (0,1 M in 1 M NaCl, pH 8,0) im Wechsel konnte das Gel in eine 1-1,7 x 10 cm große Säule gegossen werden.

Vor der Benutzung wurde die Säule gegen Startpuffer (0,2 M Tris-HCl-Puffer in 0,5 M NaCl, pH 8,0) äquilibriert. Die Absorption wurde mit einem empfindlichen Spektralphotometer[1] gemessen und mit einem Potentiometerschreiber[2] aufgezeichnet. Auch nach Erscheinen des 1. Peaks, der die nicht gebundenen Bestandteile der Probe enthielt, wurde noch mit 1 Säulenvolumen Startpuffer nachgespült, um dann mit Endpuffer (0,2 M Glycin-HCl in 0,5 M NaCl, pH 2,8) das gebundene CEA zu eluieren. Die CEA-positiven Fraktionen wurden zur Neutralisation in Reagenzgläsern mit vorgegebenem Startpuffer gesammelt.

3. 2.3 Zentrifugation

Das Serum für die CEA-Bestimmung wurde durch 10-minütige Zentrifugation von Nativblut in einer Laborzentrifuge (Typ UJ 3S)[3] gewonnen (3000 Upm = 1000 g). In der gleichen

---

1 Typ PM 2 A, Fa. C. ZEISS, Oberkochen
2 Typ Servogor S.RE, Fa. METRAWATT, Nürnberg
3 Fa. CHRIST, Osterode

Zentrifuge wurden die RIA-Teströhrchen nach Zugabe des 2. Antikörpers zentrifugiert (30 min, 1000 g). Unter denselben Bedingungen (30 min, 1000 g) wurde auch das ausgefällte Material nach Perchlorsäure-Extraktion von Tumor- oder Normalgeweben in 200 ml-Gläsern abzentrifugiert. Das Extraktionsendprodukt TE vor der Lyophilisation sowie absorbierte Kaninchen-Anti-CEA-Seren wurden für 1 Stunde bei 10000 g (13500 UpM) in einer CHRIST-Laborzentrifuge Typ UJ 15000 zentrifugiert.

3. 2.4 Dialyse

Der bei der Perchlorsäure-Extraktion gewonnene, stark saure Gewebsextrakt wurde in 500 - 1000 ml-Portionen in Kalle-Dialyse-Schläuche (Kaliber 38)[1] gefüllt. Die einzelnen Schläuche wurden an den Enden mit Doppelknoten oder Zwirn zugebunden und in Durchflußeimern (10 Liter) gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Bei der indirekten Methode des CEA-RIA wurden die mit Perchlorsäure extrahierten Seren in Kalle-Dialyse-Schläuche (Kaliber 18)[1] gegeben und zwar jeweils eine Doppelbestimmung in einen Schlauch, der mit einem Knoten unterteilt war. Dann wurden sie in Anlehnung an den CEA-ROCHE-Test[2] für 12 Std. gegen die 50fache Menge aqua dest. mit 2 - 3maligem Flüssigkeitswechsel und schließlich gegen Phosphatpuffer (0,01 M, pH 8,0) dialysiert (in Glasgefäßen von 5 - 10 l). Gegen diesen Puffer (Startpuffer) mußten auch die Kaninchenseren vor der Auftrennung auf der DEAE-Zellulosesäule äquilibriert werden (Kalle-Dialyse-Schläuche Kaliber 20, 1 - 2 l-Becherglas, 12 Std.). Bei der Dialyse in Glasgefäßen wurde durch Magnetrührer für ständige Durchmischung der Dialyseflüssigkeit gesorgt.

3. 2.5 Einengung

Der dialysierte Gewebsextrakt (Volumen zwischen 2 und 4 l)

wurde in einem AMICON-Ultrafiltrationssystem[3] eingeengt, das aus einer Preßluftflasche, einer Einengungszelle (Amicon UF 400) mit eingebautem Rührmagneten, einem 4 l-Vorratsbehälter und einem automatischen Endpunktüberwachungsgerät (EC 2o) besteht. Eingeengt wurde in einer 1. Zelle mit Diaflo-Membranen vom Typ XM 50[4] (Ausschlußgrenze etwa ab Molekulargewicht 45000) und in einer dahintergeschalteten 2. Zelle mit einer Membrane vom Typ PM 10 (Ausschlußgrenze etwa MG 12500). Bei einem Druck von 5 kp/cm^2 wurde der Extrakt auf 200 ml eingeengt. Anschließend wurden 2 l aqua dest. nachgefüllt und schließlich auf ein Volumen von 60 - 80 ml eingeengt. Gepoolte Säulenchromatographie-Fraktionen größeren Volumens wurden ebenfalls mit dem Amiconsystem in kleineren Zellen (UF 200 und UF 80) eingeengt.

Für kleinere Fraktionen wurden Kollodiumhülsen (SM 132 00)[4] aus Zellulosenitrat in der Größe 15 x 75 mm benutzt, die mittels einer Haltevorrichtung (SM 16311)[4] an das Vakuum einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen waren. Waren die Fraktionen für eine erneute Chromatographie vorgesehen, wurden sie gegen den Elutionspuffer der nächsten Säule eingeengt und damit äquilibriert.

Einige Serumproben mit besonders hohen CEA-Spiegeln wurden mit Minicon A 25[3] (Einengung 4:1, Ausschlußgrenze MG 30000) zur Untersuchung mit der Ouchterlonymethode eingeengt.

3. 2.6 Lyophilisation

Der eingeengte und entsalzte Tumor- bzw. Normalextrakt (Volumen durchschnittlich 70 ml) wurde in einem 500 ml-Rundkolben im Methanolbad (-70°C) eingefroren und mit einem Lyophilisiergerät[5] gefriergetrocknet. Gereinigtes CEA wurde in 5 ml-Gläschen unter einer Lyophilisierglocke gefriergetrocknet.

---

1 Fa. KALLE, Wiesbaden
2 Fa. HOFFMANN-LA ROCHE, Grenzach
3 Fa. AMICON, Oosterhout, Holland
4 Fa. SARTORIUS, Göttingen
5 Fa. CHRIST, Osterode

3. 3 Herstellung von Antiseren

3. 3.1 Immunisierung

Zur Immunisierung wurden Kaninchen verwandt (weiße Neuseeländer und Grauschecken, Gewicht 4 - 5 kg). Es wurden Antiseren gegen Tumorextrakt (TE), gegen Lungenextrakt (LE), gegen Dickdarmextrakt (NE), gegen vorgereinigte Fraktionen und gegen reinste, durch die Affinitätschromatographie erhaltene CEA-Präparationen hergestellt.

Für die Erstimmunisierung wurde, in Anlehnung an ein Schema von Hijmans et al. (76), das Antigen (100 - 500 µg gereinigtes CEA bzw. 10 mg TE, NE oder LE) in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst, mit komplettem Freundschem Adjuvans gemischt und subcutan in alle vier Pfoten des Kaninchens gespritzt. Eine Woche später wurde die gleiche Immunisierung mit inkomplettem Freundschem Adjuvans wiederholt. Danach folgte eine Serie von intravenösen Injektionen einer KAl-Suspension des Antigens, die folgendermaßen hergestellt wurde:

Zu einer Lösung von 500 µg gereinigtem CEA bzw. von 10 mg anderem Material in 2,5 ml gepufferter phys. Kochsalzlösung wurden 1,15 ml 1 M Na-Bikarbonat-Lösung und tropfenweise 2,5 ml 10%ige KAl-Sulfat-Lösung pipettiert. Diese Suspension wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und dann 30 min bei 1000 g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 4 ml phys. Kochsalzlösung suspendiert und in 0,5 ml-Portionen eingefroren. Diese Suspension wurde 3 Wochen nach der subcutanen Immunisierung nach folgendem Schema in die Ohrvene des Kaninchens injiziert:

1. Woche:	0,05 ml	0,1 ml
2. Woche:	0,1 ml	0,2 ml
3. Woche:	0,2 ml	0,4 ml

Nach einer weiteren Woche wurde dem Kaninchen eine Blutprobe entnommen und das Serum mit der Immundiffusionsmethode nach Ouchterlony auf Antikörper untersucht. War das Ergebnis zu-

friedenstellend, wurde das Kaninchen entblutet. Bei fehlender Antikörperbildung wurde die Immunisierung abgebrochen, da weitere Injektionen das Ergebnis kaum noch verbesserten.

3. 3.2 Absorption und Reinigung der Antiseren

Wurden mit der Ouchterlony-Methode im erhaltenen Kaninchenserum Antikörper gegen Verunreinigungen nachgewiesen, z. B. gegen Serumproteine oder gegen Normalextrakt (NE oder LE), so wurde mit einer Absorptionsreihe die für eine Vollabsorption nötige Menge an diesen Substanzen ermittelt. Da diese in lyophilisierter Form vorlagen, wurden sie abgewogen und im Kaninchenserum gelöst. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C und einer Über-Nacht-Inkubation bei 4°C wurden die ausgefällten Antigen-Antikörper-Komplexe bei 10000 g abzentrifugiert.

Da viele Untersucher eine immunologische Kreuzreaktion von CEA mit Blutgruppensubstanzen fanden, wurde eine Absorption mit AB-Erythrozyten angeschlossen. Dazu wurde das Kaninchenserum durch 30- minütiges Erhitzen auf 56°C dekomplementiert und mit Erythrozytenkonzentrat, das vorher mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen worden war, im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37°C und einer Zentrifugation von 10 min bei 700 g wurde das Serum vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgehoben. Dieser Vorgang wurde 3 - 4 x wiederholt, bis bei Prüfung von Antiserum gegen AB-Erythrozyten auf einem Objektträger weder makroskopisch noch mikroskopisch eine Agglutination feststellbar war.

Zur Entfernung der mit der Absorption zugefügten, überschüssigen Substanzen wurden die Antiseren nach Zentrifugation bei 10000 g noch einer Chromatographie auf einer DEAE-Zellulosesäule unterworfen. (Näheres s. S. 18)

3. 3.3 Prüfung von Spezifität und Reinheit des Antiserums

Die einzelnen eluierten Fraktionen der DEAE-Zellulosesäule wurden in der CAF-Elektrophorese untersucht. Reine IgG-Fraktionen wurden gepoolt und in 0,1 - 1,0 ml-Portionen eingefroren.

Die Anti-CEA-Seren wurden vor und nach Absorption sowie nach der Reinigung auf der DEAE-Zellulosesäule in der Ouchterlony-Doppeldiffusion im Vergleich mit einem Anti-CEA-Referenzserum auf ihre Aktivität gegen Tumorextrakt geprüft. Außerdem wurde ihre Reaktion gegen die Normalextrakte NE und LE sowie gegen Normalserum getestet.

3. 4 Berechnungen

3. 4.1 Markierung

Für die Berechnungen bei der Markierung wurde ein Tischrechner[1] mit einem speziellen Programm benutzt. An Hand der Zählraten wurden zunächst der Aktivitätsverlust (an Pipettenspitze und Reaktionsgefäß) in Prozent der Gesamtaktivität und die prozentuale Verteilung der Aktivität auf Protein- und Salzpeak der 1. Säule ermittelt. Danach wurde die im Proteinpeak enthaltene Aktivität in mCi und nach Eingabe der zur Markierung verwandten Menge CEA der davon im Proteinpeak enthaltene Anteil und die spezifische Aktivität berechnet.

Radioaktivität und Proteinmenge der Fraktionen der 2. Säule, die wir für den RIA verwandten, errechneten sich über die Gesamtaktivität der Säulenfraktionen und die spezifische Aktivität. Es wurde dabei vorausgesetzt, daß das gesamte Protein gleichmäßig mit ^{125}I markiert war.

3. 4.2 Antikörperverdünnungskurve und RIA

Die RIA-Berechnungen wurden mit einem programmierbaren Taschenrechner (HP 65)[2] durchgeführt. Für die Berechnung

---

1 OLIVETTI P 101
2 Fa. HEWLETT-PACKARD

der Antikörperverdünnungskurve wurden zunächst die Zählraten der unspezifischen Bindung (N-Wert) von allen anderen abgezogen. Dann wurde bei den einzelnen Verdünnungsstufen das Verhältnis der gebundenen Aktivität zur Gesamtaktivität (Totals) in Prozent ausgerechnet und in ein Diagramm eingetragen (Ordinate: %Aktivität, Abszisse: Verdünnungsstufen).

Bei der Auswertung des RIA wurde ebenfalls der N-Wert von den anderen Zählraten abgezogen. Zuerst wurde die maximale Bindung (O-Wert) in Prozent der Gesamtaktivität berechnet. Die Zählraten der Standardproben wurden in Prozenten des O-Wertes berechnet und auf einem lin-log-Papier in ein Diagramm eingetragen (Ordinate: Prozentwerte, Abszisse: CEA-Konzentration). Mit einem Kurvenlineal wurde die typische s-förmige Kurve ausgezogen, auf der dann die CEA-Werte der Analysenproben abgelesen werden konnten. Wird die Bindungsaktivität nicht linear, sondern als logit (logit-log-Papier)

$$\text{logit } l = \ln \frac{p}{100-p} \qquad p\text{: Aktivität in \%}$$

aufgetragen, ergibt sich in vielen RIA-Systemen, wie auch beim CEA-Assay, eine lineare Beziehung zwischen der gebundenen Aktivität (in logits) und dem Logarithmus der zugehörigen CEA-Konzentration und damit eine Gerade. Nach einem speziellen Programm (100) ließen sich nach Eingabe der logit-log-Werte des Standards der lineare Korrelationskoeffizient, die Standardabweichung $s_{y.x}$ und die lineare Regressionsgleichung mit den Geradenparametern A und B berechnen. Der Rechner war so programmiert, daß dann nach Eingabe der Zählraten der Analysenproben unmittelbar deren CEA-Konzentration ausgegeben wurde.

3. 4.3 Statistische Berechnungen

Folgende statistische Berechnungen wurden nach speziellen Programmen auf den oben genannten Rechnern durchgeführt:

Für die Meßwerte verschiedener Kollektive wurden

arithmetisches Mittel ($\bar{x}$), Standardabweichung (s), Varianz (s^2) und Variationskoeffizient (V.K.) ermittelt. Bei Patientenkollektiven wurden für die gemessenen Parameter Häufigkeitsverteilungen für Konzentrationsbereiche bestimmt, die entweder willkürlich nach sinnvollen Kriterien zusammengefaßt oder in Klassen mit äquidistanten Bereichen eingeteilt wurden. Zur Korrelationsberechnung wurde bei annähernder Normalverteilung der lineare Korrelationskoeffizient r bzw. bei zu großer Abweichung der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient r_s ermittelt und nach Signifikanztabellen gegen 0 geprüft. Häufigkeitsdaten wurden im Vierfelder-Chi-Quadrattest bzw. im rxc-Tafel-Chi-Quadrattest, durch den exakten Test von Fisher und nach dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test geprüft.

4 MATERIALIEN UND PATIENTENGUT

4. 1. Materialien

4. 1.1 Zur Extraktion verwandte Gewebe

Zur Herstellung des Tumorextraktes wurden insgesamt 110 primäre Adenokarzinome des Dickdarms extrahiert, die alle histologisch gesichert waren. (Herkunft der Operationspräparate und der histologischen Diagnosen siehe Tab. 1)
Es handelte sich ausschließlich um Operationspräparate, die bis spätestens 3 Stunden nach der Operation von normalem Gewebe freipräpariert, in Plastiktüten eingeschweißt, beschriftet und bei -70°C eingefroren worden waren.

Als Normalgewebe wurden der Dickdarm und ein Teil der Lunge eines frisch obduzierten Patienten, der nicht an einem malignen Tumor verstorben war, extrahiert (LE und NE

GESAMMELTE ANZAHL	DICKDARM-ADENOKARZINOME CHIRURGISCHE KLINIK	ZUR TUMOREXTRAKTHERSTELLUNG HISTOL. DIAGNOSE
48	CHIRURG. UNIV. KLINIK (PROF.DR.G.HEBERER)	PATH. INST. D. UNIV. (PROF.DR.M.EDER)
29	MARIA-THER.-KLINIK (PROF.DR.R.TAUBER †) (OA DR. R. SCHOPP)	PATH. INST. D. UNIV.
26	KH D. 3. ORDENS MÜNCHEN-NYMPHENBURG (CA DR.B.PERMANETTER) (CA DR.O.WIESEND)	PATH. INST. SCHWABING (PROF.SINGER/DR.H.BARTH)
3	KRECKE-KLINIK (DR.W.HARTL)	PATH.INST.NYMPHENBURG (PROF.DR.F.OCCHIONERO)
2	STÄDT.KH HARLACHING (CA PD DR.E.KUGEL)	PATH.INST.KH HARLACHING (CA PD DR.B.STAMPFL)
1	RINECKER-KLINIK (DR.HEUBECK,DR.DANNIG)	PATH. INST. D. UNIV.
1	PR.-KLINIK PROF.W.HART	PATH. INST. D. UNIV.
110		

TABELLE 1

5-75). Außerdem wurden die Teile der Operationspräparate, die weiter als 7 cm vom Tumor entfernt waren, verwandt. (NE 11-74 und NE 3-75)

4. 1.2 Antiseren

Die für den RIA und die Affinitätschromatographie erforderlichen Anti-CEA-Seren waren eigene Präparationen. Zwei Anti-CEA-Serum-Chargen von der Ziege (freundlicherweise überlassen von Prof. HIRATA von der University of Kansas, Laurence, USA) standen uns als Referenzserum zur Verfügung. Mono- und polyvalente Antiseren gegen menschliche Serumproteine (Fa. BEHRINGWERKE, Marburg) wurden zur Überprüfung des Tumorextraktes und der Säulenfraktionen auf Verunreinigungen benutzt.

4. 1.3 Vergleichs-RIA

Als Vergleichs-RIAs dienten der CEA-ROCHE-Test und der Test der Fa. ISOTOPENDIENST WEST. Es wurde bei der Durchführung nach den Angaben der Hersteller verfahren (83, 146).

4. 1.4 RIA-Standard

Als RIA-Standard diente eine eigene vorgereinigte CEA-Präparation (G 200/I), die an dem RIA-Standard der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE geeicht worden war.

4. 2 Patientengut

Die Serum- Urin- und Fruchtwasserproben stammten von Patienten der folgenden Kliniken:

I. und II. Med. Klinik der Univ. München
Chir. Klinik der Univ. München
Maria-Theresia-Klinik

Urologische Klinik der Univ. München
I. und II. Frauenklinik der Univ. München
Klinik für gyn. Tumoren, Bad Trissl

4. 2.1 Normalkollektiv

Es wurden 60 Serumproben von gesunden jungen Männern im Alter von 18 - 22 Jahren (Bundeswehrrekruten) untersucht. Darin waren alle Blutgruppen des A-B-0-Systems vertreten.

4. 2.2 Patienten mit malignen Erkrankungen

4. 2.2.1 Dickdarmkarzinom

Der CEA-Spiegel wurde bei 109 Patienten mit histologisch gesichertem Dickdarmkarzinom im Alter von 29 bis 83 Jahren (davon 81% über 50 Jahre) bestimmt. Das Verhältnis Männer zu Frauen betrug 49 zu 60. Bei 50 Patienten konnten Verlaufsbestimmungen mit prä- und postoperativen Werten durchgeführt werden, darunter 16 mal über einen längeren Zeitraum zwischen 4 und 27 Monaten, bei 42 Patienten nur präund bei 17 Fällen nur postoperative Bestimmungen. Es wurden nur Patienten berücksichtigt, bei denen der Metastasierungsgrad bekannt war. Es erfolgte eine Einteilung in 4 Stadien, nämlich Stadium I: Lokalbefund (entsprechend Dukes A+B), Stadium II: regionale Metastasierung (Dukes C), Stadium III: Fernmetastasierung (Dukes D) und Stadium IV: Finalstadium (Dukes D). Dabei ergab sich eine Häufigkeitsverteilung für die präoperativen bzw. inoperablen Fälle von 30:27:29:6.

4. 2.2.2 Mammakarzinom

Es wurden Serumproben von 675 Patientinnen im Alter von 26 bis 85 Jahren (81,3% zwischen 40 und 70 J.) untersucht, die wegen eines Mammakarzinoms mastektomiert worden waren.

Die Operation lag zum Zeitpunkt der 1. CEA-Bestimmung einige Monate bis maximal 28 Jahre zurück. (29% bis 1 J., 52% zwischen 1 und 5 J., 19% über 5 J.). Bei 429 Patientinnen ergab sich trotz eingehender Untersuchungen (Röntgen, Szintigraphie) kein Anhalt für Metastasen oder ein Rezidiv, während bei 246 Kranken eine Aussaat nachgewiesen werden konnte. In 69 Fällen konnten 3 - 10 Verlaufsbestimmungen über einen Zeitraum bis zu 24 Monaten durchgeführt werden, während bei den meisten Patientinnen der CEA-Spiegel nur ein- oder zweimal bestimmt werden konnte. Die Kranken mit nachgewiesener Aussaat standen unter hormoneller und/oder zytostatischer Behandlung bzw. unter Strahlenbehandlung. Zur Beurteilung des Therapieerfolges wurden vor allem die Röntgen- und Szintigraphiebefunde herangezogen, bei Haut- und Lymphknotenmetastasen der Lokalbefund.

4. 2.2.3 Andere maligne Erkrankungen

Von 50 Patienten mit Blasentumoren (ausschließlich Männer, Alter zwischen 41 und 83 J.) konnten präoperative Serum- und Urinproben (Mittelstrahlurin) untersucht werden. Nach der histologischen Untersuchung handelte es sich in 23 Fällen um ein invasiv wachsendes Blasenkarzinom, zehn davon mit nachgewiesener Metastasierung. Die restlichen 27 Fälle mit einer Papillomatose waren in Grad 0 (n=6), Grad I (n=11), Grad II (n=6) und Grad III (n=4) differenziert. Bei allen Patienten wurde eine Untersuchung des Urinsediments durchgeführt. Zum Vergleich wurde der CEA-Spiegel im Urin von 90 Personen ohne urologische Erkrankung bestimmt.

Außerdem wurden die Serumproben von 33 Patienten mit histologisch gesichertem Magenkarzinom (Geschlechtsverteilung m/w : 17/16, Alter zwischen 35 und 80 Jahren), von 18 Patienten mit Pankreaskarzinom (m/w : 11/7, Alter zwischen 33 und 79 J.) und von 16 Patienten mit primärem Leberzellkarzinom (m/w : 9/7, Alter zwischen 14 u. 77 J.) bestimmt.

4. 2.3 Patienten mit nicht malignen Erkrankungen

Einen Überblick über das Patientengut mit nicht malignen Erkrankungen gibt Tabelle 2.

Die Diagnose war bei allen Patienten mit Leberzirrhose und Colitis ulcerosa histologisch und bei den Patienten mit Hepatits histologisch und/oder klinisch-chemisch gesichert. Die radioimmunologische Bestimmung des HB_s - Antigens, die bei 45 Hepatitispatienten durchgeführt wurde,

	Zahl der Patienten	Geschlechtsverteilung m/w	Altersverteilung
Hepatitis	112	58/54	15-75 J. 55% unter 40 J.
davon akute H.	88		
Leberzirrhose	148	103/45	20-83 J.
M.Crohn	20	12/8	19-66 J.
Colitis ulcerosa	14	6/8	19-54 J.

Tabelle 2

war in 32 Fällen positiv. Bei 33 Fällen mit Hepatits und 31 Fällen mit Leberzirrhose konnten 2 - 10 Verlaufsbestimmungen über einen Zeitraum von 1 - 12 Wochen (Hepatitis) bzw. 1 - 24 Monate (Leberzirrhose) durchgeführt werden. Die CEA-Spiegel aller Patienten mit Colitis ulcerosa konnten über einen längeren Zeitraum beobachtet werden (1 - 24 Monate mit 4 - 14 CEA-Bestimmungen).

4. 2.4 Schwangere und Neugeborene

CEA-Bestimmungen wurden im Serum von 138 schwangeren Frauen (15. - 42. SSW) und von 94 Neugeborenen (Nabelvenenserum) sowie im Fruchtwasser von 135 schwangeren Frauen durchgeführt.

5 ERGEBNISSE

5. 1 Methodischer Teil

5. 1.1 Gewebe-Extraktion

Mit der in Abbildung 1 im Flußdiagramm gezeigten und in der Methodik genauer beschriebenen Folge von Homogenisierung, Perchlorsäure-Extraktion, Zentrifugation, Dialyse und Lyophilisation wurden aus durchschnittlich 25 Tumoren mit einem Feuchtgewicht von etwa 1000 g ungefähr 2 g Eiweißextrakt als grauweißes Pulver gewonnen (TE I). Der Extrakt aus der 2. Amiconzelle (MG unter 50000), ein feines weißes Pulver, wurde als TE II bezeichnet. Aus 300 g Lungengewebe konnten als weiße, lockere und sehr leichte Substanz 1100 mg Lungenextrakt LE gewonnen werden, aus einem normalen Dickdarm mit 250 g 700 mg Normalextrakt NE als graues Pulver.

Abbildung 2 zeigt die CAF-elektrophoretische Auftrennung von TE, LE, und NE im Vergleich zu Normalserum. Die Extrakte enthalten Anteile aus allen Bereichen, NE und TE mit einer Häufung im Albuminbereich, während es sich beim Lungenextrakt vorwiegend um Substanzen mit Beta- und Gamma-Mobilität handelt.

In Abbildung 3 werden TE I und TE II mit der Ouchterlonymethode gegen ein Anti-CEA-Referenzserum (Hir) und gegen zwei eigene Anti-CEA-Seren auf ihren CEA-Gehalt untersucht. Es zeigt sich, daß CEA nur in TE I enthalten ist. In der Ouchterlony- Untersuchung von TE, NE und LE gegen verschiedene monospezifische Antiseren gegen einzelne menschliche Serumproteine (Abbildung 4) erweist sich, daß die Extrakte als hauptsächliche Verunreinigungen $Alpha_1$ - Antitrypsin und $Alpha_1$ - Glycoproteid enthalten. Auch in der immunelektrophoretischen Untersuchung von TE gegen Antihumanserum zeigten sich mehrere Serumproteine unterschiedlicher Mobilität.

CEA - ISOLIERUNG

A. TUMOR - EXTRAKTION

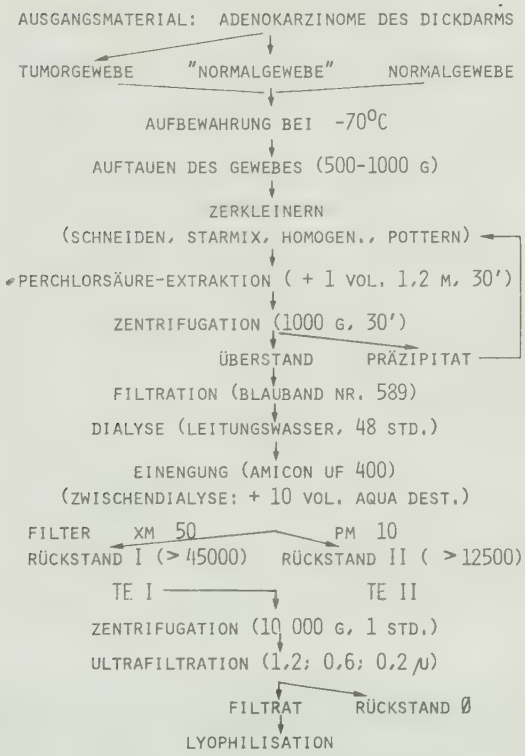


ABBILDUNG 1

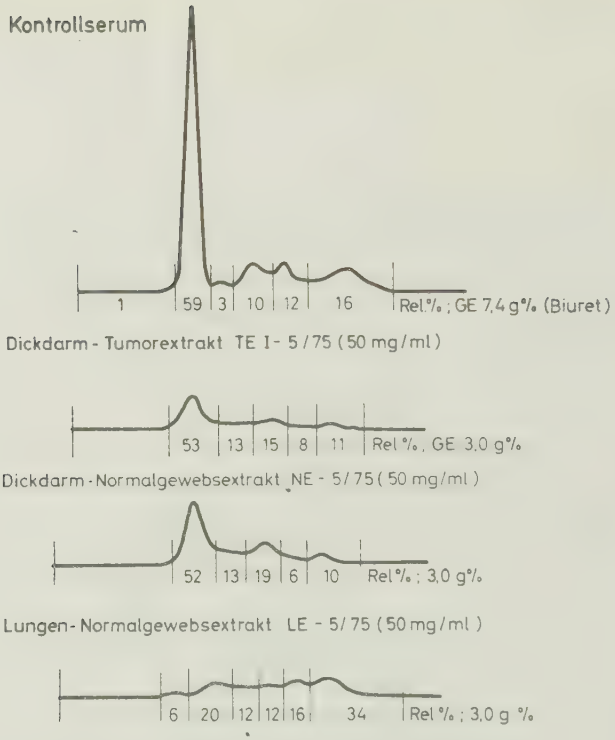


ABBILDUNG 2

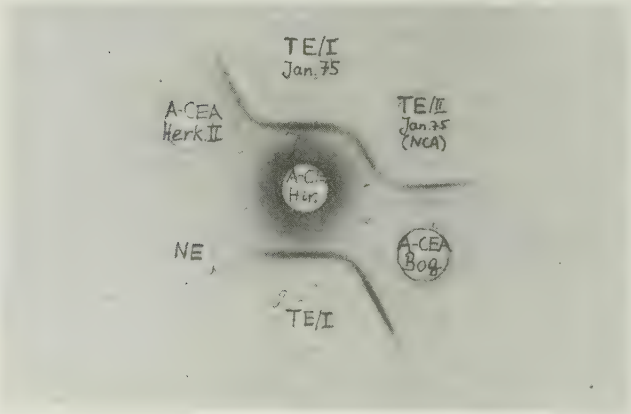


ABBILDUNG 3

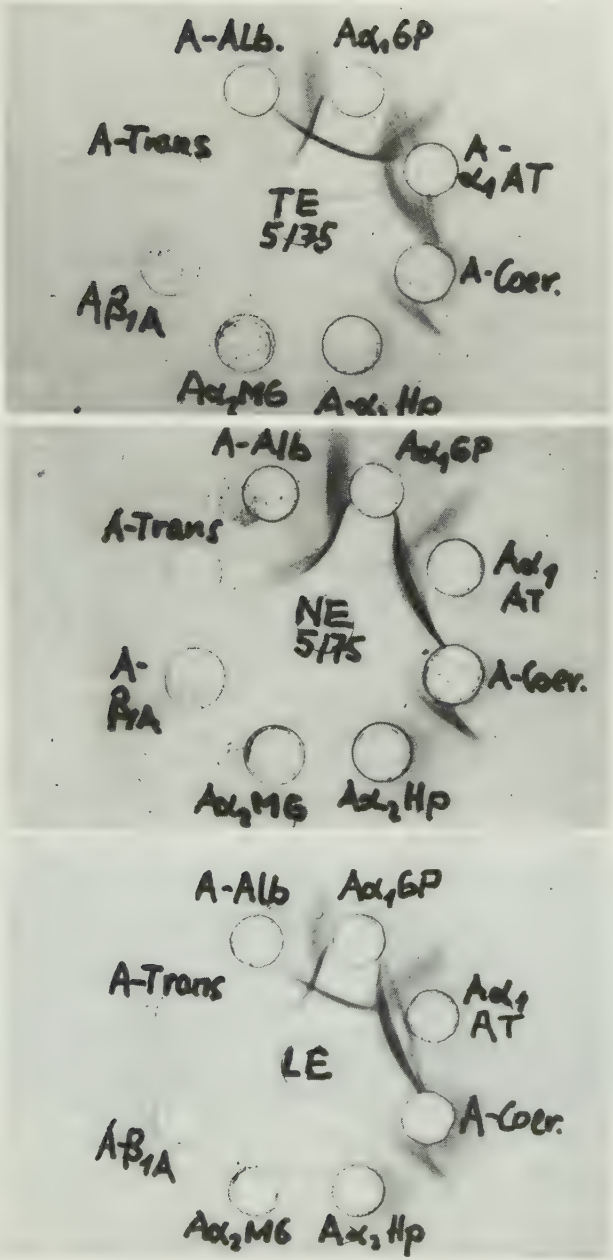

A-Alb.
Aα1GP
A-Trans
A-α1AT
TE
5/135
A-Coer.
Aβ1A
Aα2M6
A-α2Hp
A-Alb
Aα1GP
A-Trans
Aα1 AT
NE
5/175
A-Coer.
Aβ1A
Aα2M6
Aα2Hp
A-Alb
Aα1GP
A-Trans
Aα1 AT
LE
A-Coer.
Aβ1A
Aα2M6
Aα2Hp

ABBILDUNG 4

Radio-immunologisch wurde ein CEA-Gehalt von etwa 20 mg in 2 g TE (entspricht einer Tumormasse mit einem Feuchtgewicht von 1 kg) bestimmt.

5. 1.2 Reinigung des Antigens

Anfangs wurde zur weiteren Reinigung des Tumorextraktes eine Sephadex G 200 - Säule benutzt. Um festzustellen, in welcher Fraktion CEA eluiert wurde, wurde ein Lauf mit TE unter Zusatz von 25 ul (entspricht 6,25 ng) radioaktiv markiertem CEA der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE durchgeführt. Wie Abbildung 5 zeigt, findet sich das CEA vorwiegend in der Zwischenfraktion zwischen dem 1. und 2. Hauptpeak.

Um höhermolekulare Substanzen besser abtrennen zu können, wurde ein Lauf mit einer Sepharose 6B-Säule vorgeschaltet. Das Eluat wurde in kleinen Fraktionen gesammelt (Ia, Ib, II-IV). CEA ließ sich mit der Ouchterlonymethode ausschließlich in den Fraktionen Ib und II nachweisen. Serumproteine fanden sich überwiegend in Fraktion III, nicht aber in Fraktion Ib und II (Abb. 6). Diese beiden Fraktionen wurden bei den weiteren Läufen (Chromatogramm Abb. 7) zur Fraktion II zusammengefaßt.

Fraktion II wurde auf einer Sephadex G 200 - Säule rechromatographiert (Chromatogramm Abb. 7). Das Eluat wurde in 3 Fraktionen gepoolt wobei CEA in Fraktion I enthalten war. Diese Fraktion wurde im abschließenden Reinigungsschritt der Affinitätschromatographie mit CnBr-aktivierter Sepharose (mit gekoppeltem Anti-CEA-Serum) unterworfen. Als Antikörper diente selbst hergestelltes, nach mehreren Absorptionen (Normalserum, NE, LE und AB-Erythrozyten) monospezifisches Anti-CEA-IgG. Das Chromatogramm gibt Abb. 8 wieder (durchgezogene Linie). Der große 1. Peak enthält die nicht gebundenen Substanzen, die mit dem Startpuffer ausgespült werden, der kleine 2. Peak das vom Antikörper gebundene und vom Endpuffer eluierte CEA. Dieses wurde nach Entsalzung und Lyophilisation als

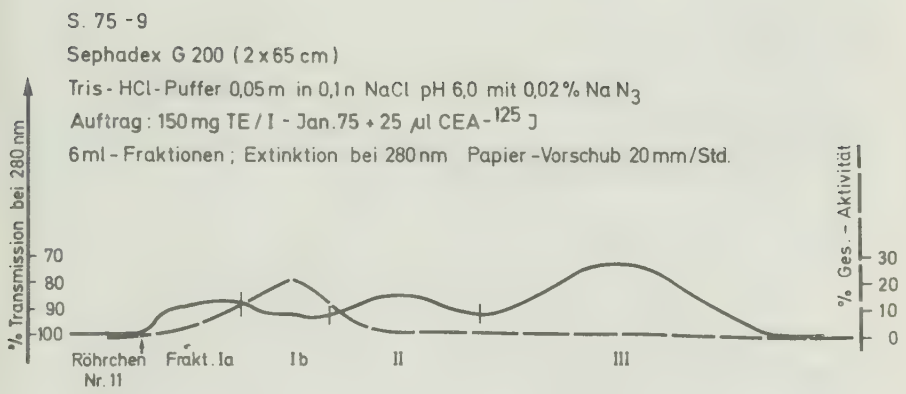


ABBILDUNG 5

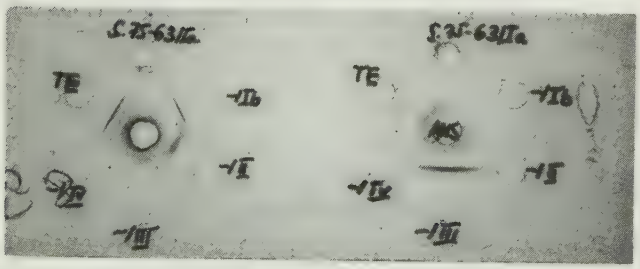
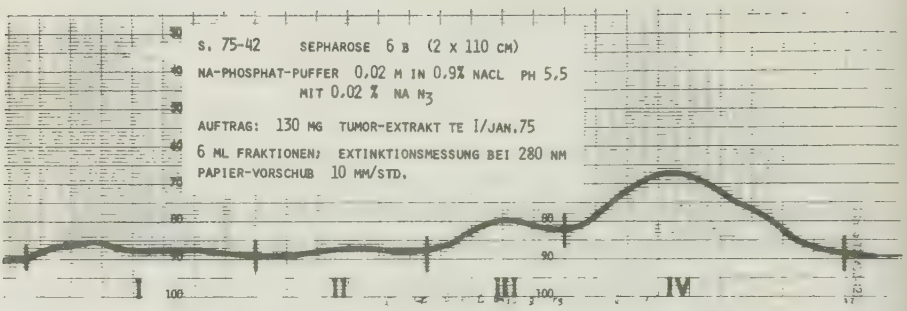


ABBILDUNG 6



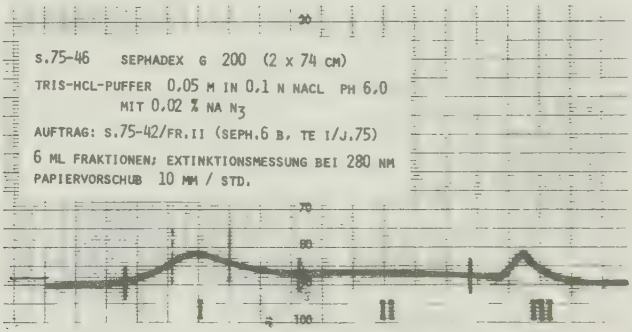


ABBILDUNG 7

CNBr-aktiv. Sepharose 4 B (1,7 x 11 cm)
Auftrag: TE I/J. 75 - G 200/II + CEA-^{125}J

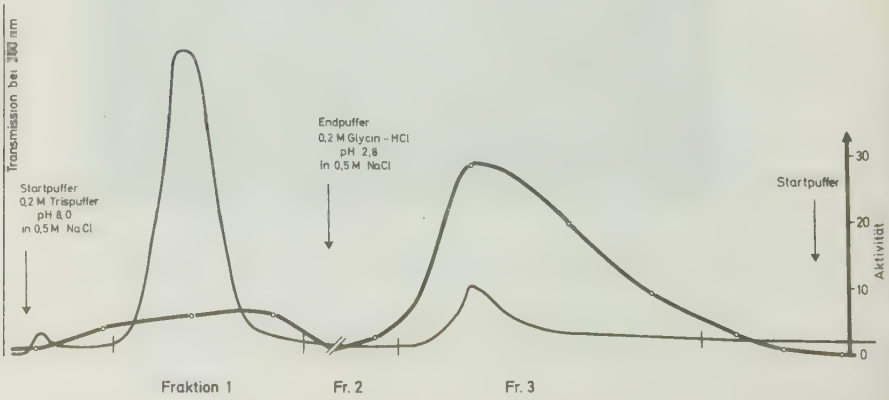


ABBILDUNG 8

feines, weißes "Gespinst" mit einem Gewicht von durchschnittlich 400 µg gewonnen. Falls die 1. Fraktion noch CEA enthielt, wurde sie rechromatographiert. Um die Wirksamkeit der Methode zu demonstrieren, wurde bei dem Lauf in Abb. 8 25 µl = 6.25 ng radioaktiv markiertes CEA (Fa. HOFFMANN-LA ROCHE) zugegeben und die Aktivität der einzelnen Röhrchen gemessen (unterbrochene Linie). Über 80% des markierten CEA wurden gebunden und mit dem 2. Peak eluiert. Bei dem mit dem 1. Peak ausgespülten Rest dürfte es sich um CEA handeln, das wegen Überladung der Säule nicht gebunden wurde (Verdrängung durch nicht markiertes CEA), oder um strahlengeschädigtes Material.

Daß es sich bei dem Protein der Fraktion 3 um gereinigtes CEA handelt, zeigt die Prüfung in der Ouchterlony-Doppeldiffusion (Abb. 9). Weder mit Antiserum gegen Humanserum und Albumin, noch mit Seren gegen Lungenextrakt (LE) und Dickdarmextrakt (NE) bilden sich Präzipitationslinien, wohl aber gegen das Anti-CEA-Referenzserum.

Eine Übersicht über die gesamte Reinigung des Antigens gibt die Abb. 10 wieder. Die Fortschritte bei den einzelnen Stufen der Reinigung werden aus Abb. 11 deutlich: Mit Antiserum gegen normalen Dickdarmextrakt (Anti-NE Max) sind im Tumorextrakt 2 Antigene nachweisbar. Nach dem ersten Reinigungsschritt (Sepharose 6 B) findet sich noch eines, das im nächsten Reinigungsschritt (Sephadex G 200) verschwindet.

5. 1.3 Herstellung von Antiseren

Es wurden insgesamt 16 Kaninchen mit CEA-haltigem Material immunisiert. Über die verschiedenen zur Immunisierung verwandten Präparationen gibt Tabelle 3 Auskunft. 10 Tage nach Abschluß der Immunisierung wurde eine Blutprobe entnommen und in der Ouchterlony- Doppeldiffusion untersucht. Bei 5 Kaninchen zeigte sich keine Reaktion gegen TE; bei dreien wurde eine schwache Linie, bei den restlichen eine starke Linie sichtbar, die mit der des Referenzserums eine Iden-

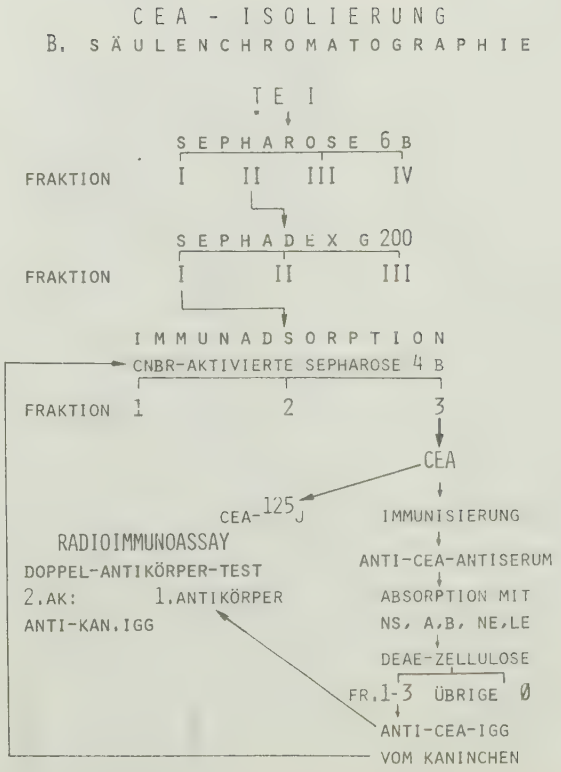


ABBILDUNG 10

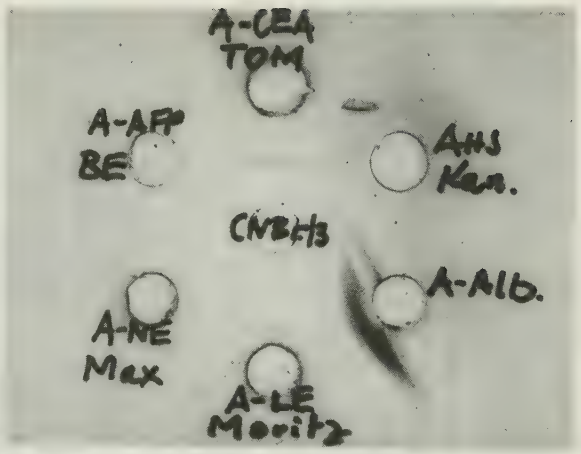


ABBILDUNG 9

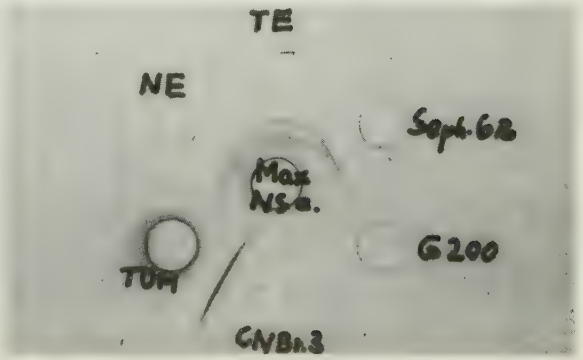


ABBILDUNG 11

ÜBERSICHT ÜBER EIGENE ANTI-CEA-SEREN VOM KANINCHEN

Nr.	N a m e (DEAE-Zell.S.)	Immunisierungs-S u b s t a n z	Anti-Serum ml	Absorption	Beurteilung
1	Bogart S.452/453	TE-K-2/I+II	28	+50 mg lyoph. NS	gutes As
2	Frodo S.461/463	TE-K-3/I	42	2 mg NS/ml As	mässiges As
3	Bilbo	TE-K-4/I	49	2 mg NS/ml As	Ø
4	Oskar S.461/463	TE 3/74	64	2 mg NS/ml As	mässiges As
5	Eberhard	TE 8/73/ G 200/I	43	2 mg NS/ml As	Ø
6	Herkules S.481	TE 6/74/ G 200/I-III	48	0,5 mg NS/ml As	gutes As
7	Barbara S.75-20	TE 6/74/G 200 S.451/456/I	33	5 mg NS/ml As	gutes As
8	Marion S.75-28	TE 6/74/G 200 S.451/456/I	50	+250 mg NS 30 ml A/B-Ery	gutes As
9	Frieda S.75-51	TE 11/74/G 200 S.469/I+S.474/I	51	+250 mg NS +200 mg NE 3/75 + 80 ml A-Ery + 80 ml B-Ery	gutes As
10	Egon	TE 11/74/G200 S.469/474/I	35	+200mg NS +PCA-NS	mässiges As
11	Goofy	CNBr 1/I/3+4	46		Ø
12	Donald	TE 1/75/ G 200/Ib	54		Ø
13	Daisy	TE 1/75/ G 200/Ib	38		Ø
14	Gipsy S.75-60 Fr.Ia,Ib	TE 1/75-K I G 200/I(S.75-27)	43	+220 mg NS +140 mg LE + 80 mg NE 11/74 + 80 mg NE 5/75 + A/B-Ery 3x	gutes As
15	Xaver S.75-77 Fr.I	TE 1/75/ Seph.6B/II/ G 200/I	45	+240 mg LE + 30 mg NS + 30 mg NE 5/75 + 30 mg NE 11/74 + A/B-Ery 3x	sehr gutes As
16	Wastl S.75-95/I	TE 1/5/75/ Seph.6B/II/ G 200/I/ CNBr/4/VIII/3 +CNBr/4/IX/3	40	+300 mg LE + 50 mg NE 11/74 + 50 mg NS + 20 mg NE 3/75 + A/B-Ery 4x	sehr gutes As

TABELLE 3

titätsreaktion zeigte. Außerdem traten bei den einzelnen Seren verschiedene zusätzliche Linien auf, die meist mit Normalserum oder Normalextrakt (Lyophilisat) wegabsorbiert werden konnten.

Die Kaninchen, die ein brauchbares Antiserum gebildet hatten, wurden entblutet, wobei zwischen 28 und 64 ml Serum gewonnen wurden. Durch Absorptionsreihen mit NS, NE und LE wurde getestet, ob und mit welchen Mengen dieser Substanzen absorbiert werden mußte. Im Fall des Antiserums Xaver (Abb. 12) war bereits nach einer Absorption mit 1 mg LE/ml Serum keine Reaktion mit LE mehr festzustellen. Anhand der Ergebnisse dieses Testes wurde das ganze Antiserum mit den entsprechenden Mengen Extrakt absorbiert. Abschließend wurden die dekomplementierten Antiseren noch mit gewaschenen AB-Erythrozyten absorbiert, bis auf dem Objektträger mikroskopisch keine Agglutination mehr festzustellen war (bei Antiserum Xaver nach dreimaliger Waschung). Die Ouchterlony- Untersuchung (Abb. 13 a) zeigte, daß das Antiserum Xaver nach Absorption keine Reaktionen mit NS, NE und LE mehr aufwies, sondern nur noch eine mit dem Referenzserum identische Linie gegen TE bildete. Dieses Verhalten zeigte auch die reine IgG-Lösung der Antiseren trotz starker Einengung auf etwa das 10-fache (Abb. 13 b). Daraus geht hervor, daß es sich um ein immunologisch reines, monospezifisches Anti-CEA-Serum handelt.

Die reine IgG-Lösung der Antiseren wurde durch Chromatographie auf einer DEAE-Zellulose-Säule gewonnen. Ein typisches Chromatogramm zeigt Abb. 14. Die ersten Fraktionen, die sich in der CAF-Elektrophorese als reines IgG erwiesen, wurden gepoolt und für den RIA und die Affinitätschromatographie verwandt.

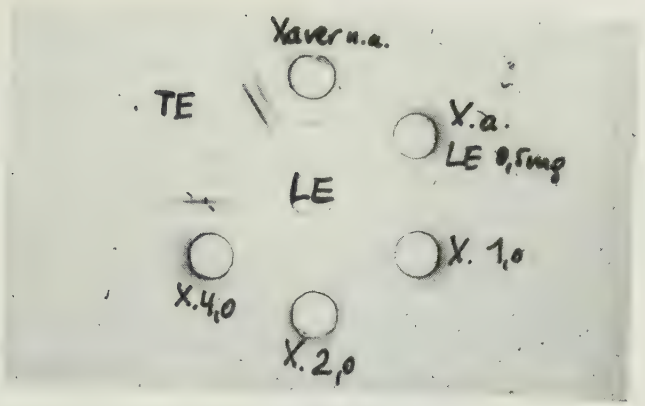


ABB. 12

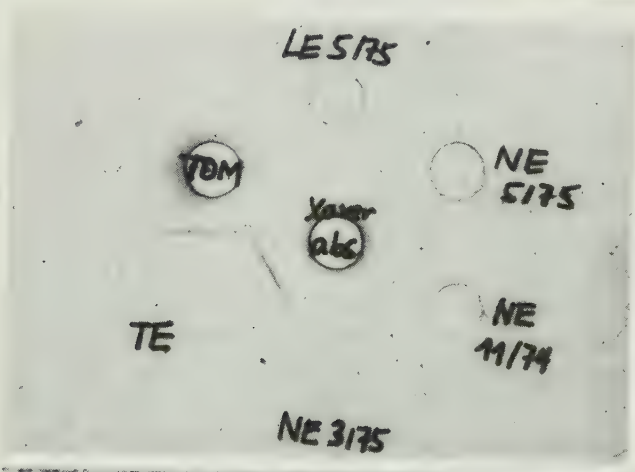


ABB. 13a

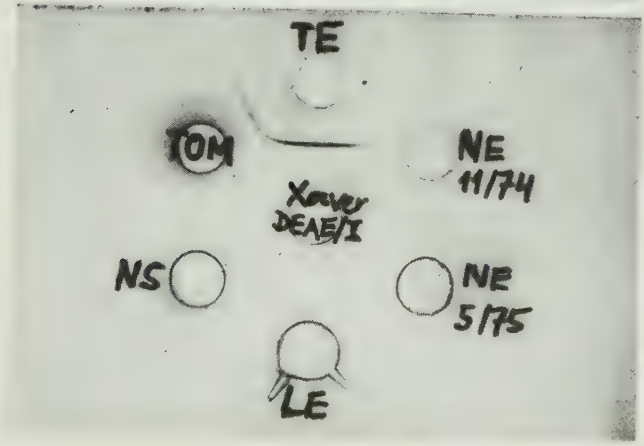


ABB. 13b

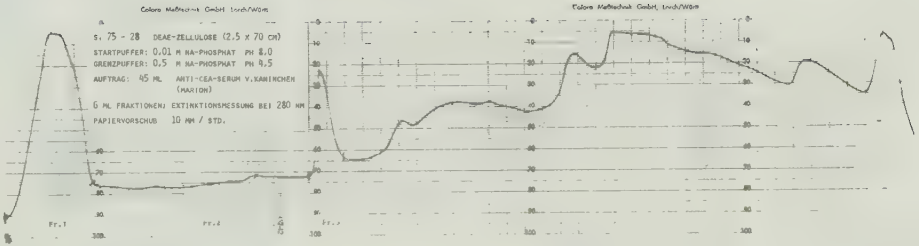


ABBILDUNG 14

5. 1.4 RIA

5. 1.4.1 Markierung

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Daten der ersten 8 Markierungen. Ab der 4. Markierung wurde als CEA-Präparation die Fraktion CnBr 4/V/3 (immunologisch reines CEA) benutzt, die wir lyophilisiert, gewogen, in Markierungspuffer gelöst und in 20 µl- Portionen mit jeweils 8 µg CEA in Eppendorfröhrchen eingefroren hatten. Bei einer Markierung wurden 8 -32 µg CEA mit 0,2 - 1,0 mCi ^{125}I zur Reaktion gebracht. Bei der Reinigung auf der Sephadex G 50 - Säule wurde zuerst ein steiler Proteinpeak eluiert (Chromatogramm s. Abb. 15 a), dann das nicht gebundene ^{125}I in einem breiteren und flacheren Salzpeak. Im Proteinpeak fand sich meist etwa die Hälfte der Radioaktivität, im angeführten Beispiel 47%. Die Fraktionen mit der stärksten Aktivität -in der Abbildung schwarz gezeichnet- wurden gepoolt und auf einer Sephadex G 200 - Säule rechromatographiert. Das Chromatogramm (Abb. 15 b) zeigte eine zweigipflige Kurve. Die Fraktionen des 1. Peaks, des aufsteigenden und des absteigenden Schenkels sowie des Maximum des 2. größeren Peaks wurden gepoolt und auf ihre Verwendbarkeit im RIA geprüft.

Bei der in Abb. 15 gezeigten Markierung enthielt die auf der Sephadex G 200 - Säule aufgetragene Fraktion 4,6 µg CEA mit einer gebundenen Aktivität von 100 µ Ci. Das entspricht einer spezifischen Aktivität von 23,5 µ Ci/ µg Protein. Für den später im RIA verwandten 1. Peak der G 200 - Säule mit den Röhrchen 13 mit 15 berechnete sich ein CEA-Gehalt von 688 ng mit einer Aktivität von 16,1 µ Ci.

EIGENE MARKIERUNG DES CARCINOEMBRYONALEN ANTIGENS MIT JOD^{125}

Nr.	mark. CEA-Charge	Radio-Aktiv. mCi (µCi/µg)	CEA µg	CEA-Charge	Verlust %	% im Prot.Peak	≙ µCi	≙ µg	spez. Aktiv. µCi/µg	µCi auf G200	mark.CEA µCi	≙ng CEA	ng CEA in 100µl
1	4/75a	0,4 (40)	10	Fr.G200	25,4	78,2	233	7,5	31,3	175,2	40,8	1300	
2	4/75b	0,4 (40)	10	Fr.I-III S.75-46	26,7	62,5	183	7,3	25,0	104,6	23,7	946	0,8
3	5/75	0,25 (50)	5	Fr.I-III S.75-46	7,2	47,0	109	4,6	23,5	101,5	16,1	688	0,6
4	7/75a	0,2 (25)	8	CNBr4/V/3	43,3	54,9	62	4,5	13,7	52,2	9,3	679	0,7
5	7/75b	0,2 (25)	5	CNBr4/V/3	47,5	47,4	50	2,6	19,0	37,8	5,9	312	
6	9/75	0,57 (36)	16	CNBr4/V/3	26,2	63,1	265	11,8	22,5	185,7	27,1	1206	0,6
7	10/75	0,6 (38)	16	CNBr4/V/3	20,2	52,1	250	12,8	19,5	201,2	35,4	1810	1,5
8	11/75	1,0 (31)	32	CNBr4/V/3	30,3	56,2	392	22,3	17,6	338,0	51,2	2912	0,8

TABELLE 4

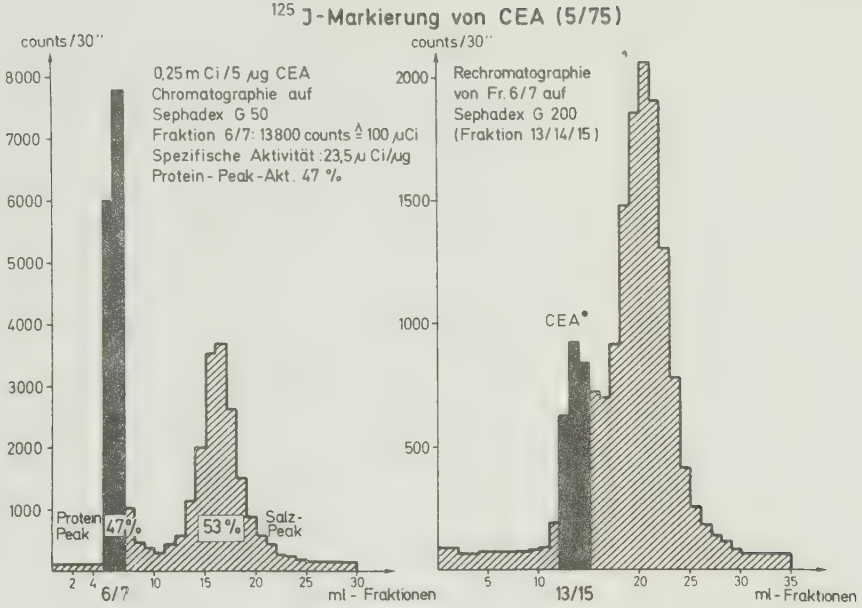


ABBILDUNG 15a

ABBILDUNG 15b

5. 1.4.2 Antikörperverdünnungskurve

Die vier bei der Markierung gepoolten Fraktionen wurden in Antikörperverdünnungsreihen auf ihre Immunoreaktivität geprüft. Als Antiseren wurden eigene Anti-CEA-Seren in einer Verdünnung von 1:400 bis 1:204800 bzw. 1:500 bis 1:256000 benutzt. Die Fraktion I erwies sich als die weitaus beste und wurde als einzige für den RIA verwendet. Abb. 16 zeigt Antikörperverdünnungskurven unter Verwendung von Fraktion I (DEAE-Zellulose-Chrom.) verschiedener Antiseren. Die maximale Bindung liegt zwischen 50 und 75%. Eine Bindung von 35%, die für den RIA angestrebt wurde, ergab sich beispielsweise bei einer Antikörperverdünnung von 1:10000 (Anti-CEA-Serum Frieda) bzw. bei 1:35000 (Anti-CEA-Serum Gipsy) bzw. 1:60000 (Anti-CEA-Serum Xaver, nicht in der Abbildung enthalten).

5. 1.4.3 Standardkurve

Als Standard wurde eine eigene vorgereinigte Präparation benutzt, die am Standard der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE geeicht worden war, als 1. Antikörper ein eigenes Anti-CEA-Serum in geeigneter Verdünnung (s. o.).

In Abb. 18 ist eine typische Standardkurve dargestellt. Die gebundene Aktivität ist auf der Ordinate in Prozenten des Nullwertes linear aufgetragen, die CEA-Konzentration auf der Abszisse logarithmisch. Es entsteht eine S-förmige Kurve, deren größte Steigung, d.h., deren größtes Diskriminanzvermögen, etwa zwischen 4 und 80 ng/ml liegt. Der gesamte Meßbereich reicht von etwa 2 ng/ml bis 160 ng/ml.

Nach dem Logit-Log-Auswerteverfahren entsteht eine Gerade, die bei den meisten Testansätzen bei etwa 20 ng/ml einen Knick aufwies (Abb. 17), sodaß eine Hauptgerade (20 - 160 ng/ml) und eine Nebengerade (2 - 20 ng/ml) unterschieden werden können.

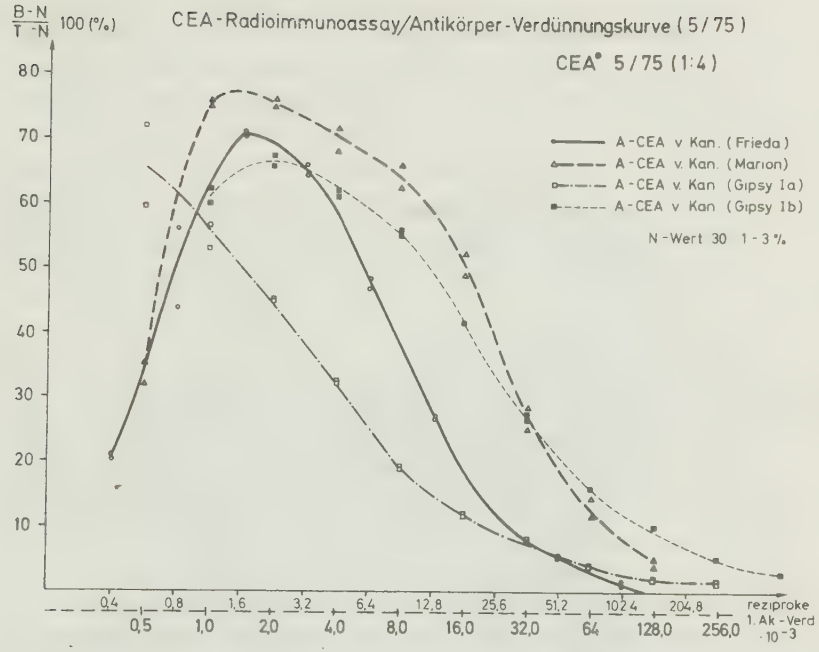


ABBILDUNG 16

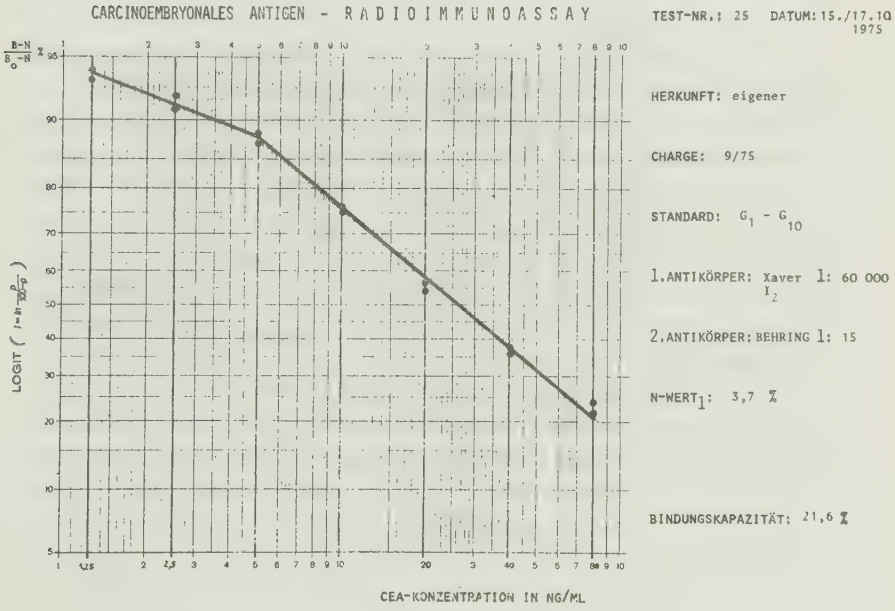


ABBILDUNG 17

CARCINOEMBRYONALES ANTIGEN - R A D I O I M M U N O A S S A Y

HERKUNFT: eigener CHARGE: 9/75 TEST-NR.: 2 5 DATUM: 15./17.10. 1975

STANDARD: G_3 - G_{10} 1.ANTIKÖRPER: Xaver I_2 1: 60 000 2.ANTIKÖRPER: BE 1: 15

N-WERT$_1$: 3,7 % BINDUNGSKAPAZITÄT: 21,6 %

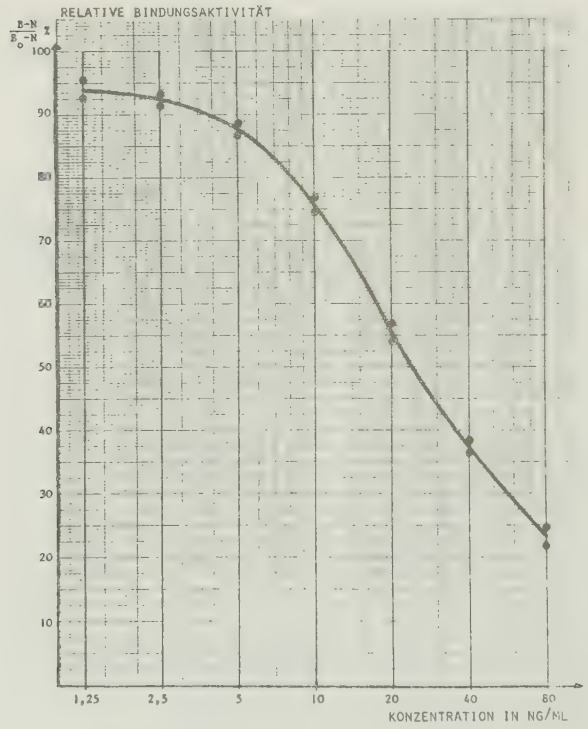


ABBILDUNG 18

29 ausgewertete Hauptgeraden wiesen bei 4 - 7 Standardkoordinatenpaaren Korrelationskoeffizienten zwischen 0,993 und 0,999 auf (Streuung $s_{y.x}$ im Mittel 0,056). Für die A-Werte (Ordinatenabschnitte) wurde ein Mittel von 3.56 $\pm$ 0,66 und ein Variationskoeffizient von 18,5% berechnet, für die B - Werte ein Mittel von -2,55 (V.K.: 13,3%). Die Bindungskapazität betrug durchschnittlich 31,3% $\pm$ 7,1% (V.K.: 22,5%). Die N - Werte lagen zwischen 2,7 und 5% (bei Verwendung des Anti-CEA-Serums Xaver).

5. 1.4.4 Spezifität, Qualitätskontrolle und Haltbarkeit

Eine Beeinflußung der CEA-Werte durch im Blut gelöste Blutgruppensubstanzen, die aufgrund der antigenetischen Ähnlichkeit von CEA und den Blutgruppensubstanzen (s.S. 6) möglich erscheint, konnte ausgeschlossen werden, da sich im Normalkollektiv Angehörige aller Blutgruppen des ABO-Systems befanden und keine pathologischen Werte auftraten. Für die Spezifität dieses Testes spricht, daß mit dem eigenen Standard, mit dem Standard der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE und mit Patientenseren mit hohen CEA-Konzentrationen parallele Verdrängungskurven entstanden. Abb. 19 zeigt parallele Verdrängungskurven bei Verwendung von Standard-ROCHE und eigenem Standard mit 2 verschiedenen Anti-CEA-Seren.

Bei der Untersuchung von identischen Kontrollseren mit einer CEA-Konzentration von 10 bzw. 20 ng/ml in 10 verschiedenen Testansätzen ergab sich eine Inter-Assay-Variation von 15%. Eine 10-fach-Bestimmung im gleichen Assay ergab eine Intra-Assay-Variation von weniger als 5%.

Pro Markierung wurden ca. 100 - 200 ml ^{125}I-CEA-Lösung entsprechend 500 - 1000 Doppelbestimmungen erhalten und in 10 ml-Portionen eingefroren. Meist wurde das markierte CEA in einer Zeit von 4 - 6 Wochen verbraucht. Dabei konnte kein Anzeichen einer Verminderung der Immunoreaktivität oder der Spezifität gefunden werden. Einen limitierenden Faktor stellt allderdings die Abnahme der Radioaktivität

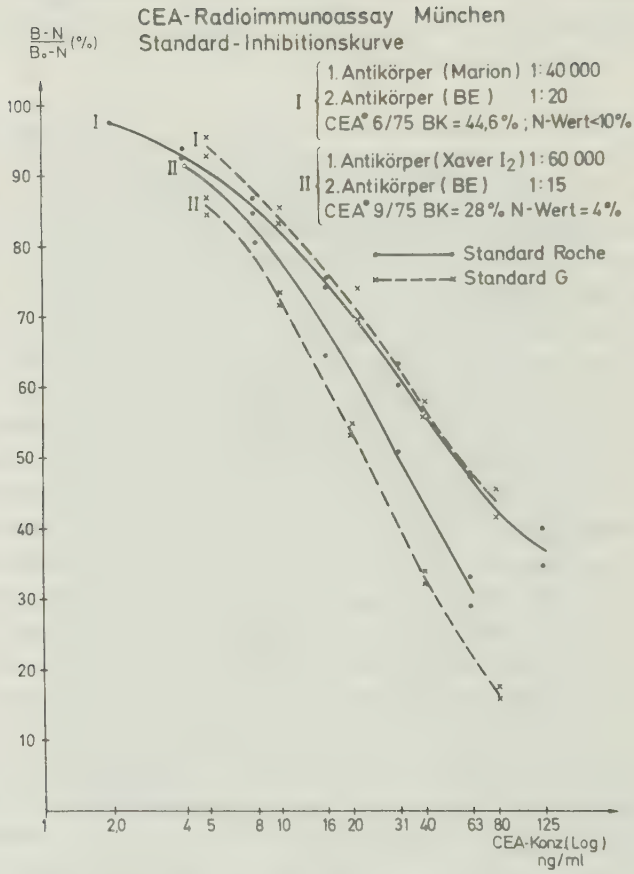


ABBILDUNG 19

dar, die aber mit einer Verlängerung der Zählzeit ausgeglichen werden konnte.

5. 1.4.5 Vergleich zwischen direktem und indirektem Test

In einem Testansatz können beim direkten Test weit über 100 Analysenproben untersucht werden, beim indirekten wegen des hohen Arbeitsaufwandes höchstens 40. Um die Notwendigkeit des aufwendigen Extraktionsschrittes zu überprüfen, wurde die CEA-Konzentration von 211 Serumproben sowohl nach dem direkten wie nach dem indirekten Verfahren bestimmt. Da bei Werten von 0 bis über 100 ng/ml ein linearer Korrelationskoeffizient von 0,961 gefunden wurde, wurde wegen dieser guten Übereinstimmung später auf die Durchführung des aufwendigen indirekten Tests verzichtet.

5. 1.4.6 Vergleich mit kommerziellen Testen

81 Blutproben wurden sowohl mit dem CEA-ROCHE-Test als auch mit dem eigenen Test untersucht. Wie aus Abb. 20 hervorgeht. waren bei 16 Proben die Werte übereinstimmend normal und bei 50 Proben übereinstimmend pathologisch. Das bedeutet eine qualitative Gesamtübereinstimmung von 81%. Teilt man die CEA-Werte in 7 Konzentrationsbereiche ein, so liegt die direkte Übereinstimmung über alle Klassen bei 57% (Tabelle 5). Die Gesamtkorrelation der 81 in Abb. 20 eingetragenen Werte ergab einen linearen Korrelationskoeffizienten $r = 0{,}895$ bzw. einen Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten r_s von 0,899.

Außerdem wurden 142 Seren sowohl mit dem eigenen Test wie mit dem Test der Fa. IDW bestimmt (s. Abb. 21). Hier lauten die entsprechenden Zahlen: Qualitative Gesamtübereinstimmung : 93%, linearer Korrelationskoeffizient: $r = 0{,}804$.

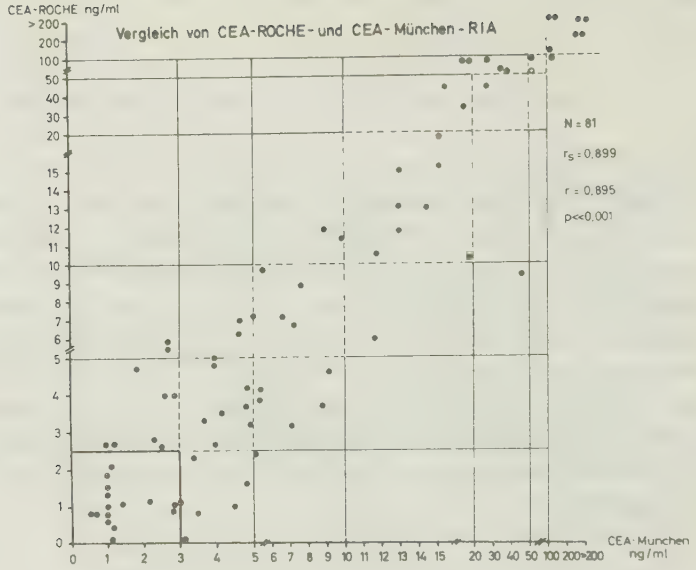


ABBILDUNG 20

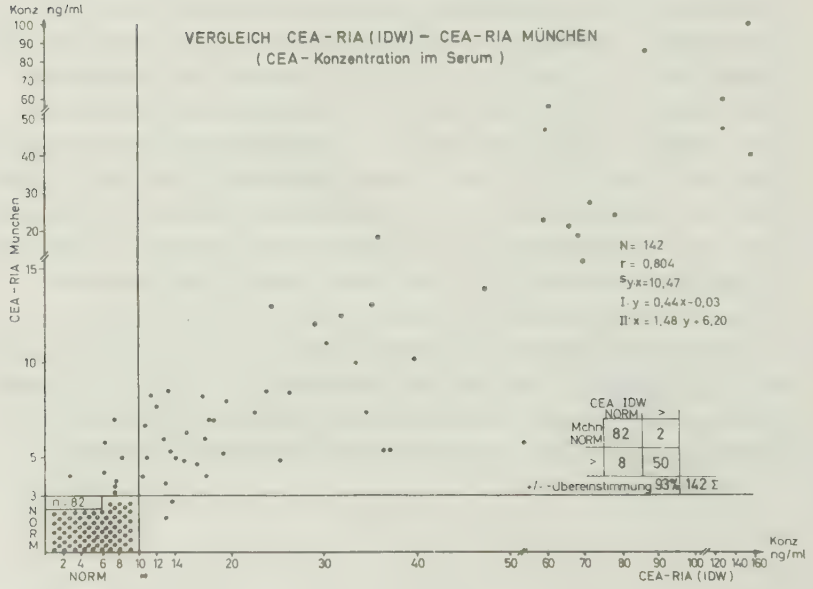


ABBILDUNG 21

VERGLEICH DER CEA-PLASMASPIEGELBESTIMMUNGEN DES ROCHE-TESTES MIT DEN CEA-SERUMSPIEGELBESTIMMUNGEN DES EIGENEN RADIOIMMUNOASSAYS

(CEA-Konzentration in ng/ml)

CEA-M / CEA-R	Norm	bis 5	bis 10	bis 20	bis 50	bis 100	>100	su.
Norm	16 (20%)	5	1					22
bis 5	7	8 (10%)	5					20
bis 10	2	3	4 (5%)	1	1			11
bis 20			2	8 (10%)				10
bis 50				2	1 (1%)			3
bis 100				2	3	2 (2%)	1	8
>100							7 (9%)	7
su.	25	16	12	13	5	2	8	81

diagonale Übereinstimmung 57%

CEA-M / CEA-R	normal	pathol.	su.
normal	16 (20%)	9	25
pathol.	6	50 (62%)	56
su.	22	59	81

Gesamt-Übereinstimmung: 82%

TABELLE 5

5. 2 Klinischer Teil

5. 2.1 CEA-Spiegel bei Normalpersonen

Bei 60 jungen Männern wurden ausschließlich Werte unter 3 ng/ml gefunden.

5. 2.2 CEA-Spiegel bei Patienten mit malignen Erkrankungen

5. 2.2.1 Dickdarmkarzinom

Bei 40 (43,5%) der untersuchten 92 präoperativen Serumproben von Patienten mit Dickdarmkarzinom lagen die CEA-Werte im Normbereich unter 3 ng/ml, bei 52 (56,5%) waren sie pathologisch. Davon waren 23 leicht bis mäßig erhöhte Werte bis 15 ng/ml und 23 stark erhöhte über 15 ng/ml. Das Serum des Patienten mit der höchsten CEA-Konzentration zeigte nach vierfacher Einengung sogar in der Ouchterlony-Doppeldiffusion eine deutliche Reaktion mit einem Anti-CEA-Serum.

Abb. 22 zeigt die CEA-Spiegel in Abhängigkeit vom Metastasierungsstadium (Einteilung siehe Abschnitt Patientengut). Bei Verlaufsbestimmungen wurde jeweils der letzte postoperative Wert berücksichtigt und mit dem präoperativen Wert verbunden. Beim Stadium I fanden sich vorwiegend niedrige, beim Stadium IV dagegen ausschließlich sehr hohe CEA-Spiegel. Nach statistischen Berechnungen zeigte sich präoperativ nur zwischen Stadium II und den zusammengefaßten Stadien III+IV ein mäßig signifikanter ($p < 0{,}025$) und zwischen Stadium I und den Stadien III+IV ein deutlich signifikanter Unterschied ($p < 0{,}001$). Bei den postoperativen Bestimmungen ließ sich auch zwischen Gruppe I und II ein signifikanter Unterschied nachweisen ($p < 0{,}01$). Die Gruppen II und III+IV ($p < 0{,}001$) und I und III+IV ($p \ll 0{,}001$) unterschieden sich deutlicher als bei den präoperativen Werten. Daraus geht hervor, daß man von der Höhe des CEA-Spiegels vor der Operation nicht sicher auf den Metastasierungsgrad schließen kann.

In Tab. 6 wurde versucht, bei 50 Verlaufsbestimmungen das Verhalten des CEA-Spiegels nach der Operation mit dem Metastasierungsgrad in Verbindung zu setzen. Es wurden 6 Tendenzgruppen gebildet:

Gruppe I: Verbleiben des CEA-Spiegels im Normbereich
Gruppe II: Abfallen des CEA-Spiegels unter 5 ng/ml
Gruppe III: Ansteigen des CEA-Spiegels aus dem normalen in den pathologischen Bereich
Gruppe IV: CEA-Spiegelabfall innerhalb des deutlich pathologischen Bereichs
Gruppe V: Gleichbleibender CEA-Spiegel im deutlich pathologischen Bereich
Gruppe VI: Anstieg des CEA-Spiegels im deutlich pathologischen Bereich

Dabei zeigten sich zwischen den ersten beiden Gruppen untereinander und den letzten vier Gruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede, wohl aber zwischen den Gruppen I+II und III ($p < 0{,}01$), zwischen I+II und IV ($p < 0{,}025$), zwischen I+II und V ($p < 0{,}01$) und zwischen I+II und VI ($p < 0{,}001$). Die zusammengefaßten Gruppen I bis II und III bis VI unterschieden sich hochsignifikant ($p \ll 0{,}001$). Bei Patienten, deren CEA-Spiegel nach der Operation im Normbereich blieb oder in den Normbereich abfiel, bestand also signifikant häufiger nur ein lokaler Tumorbefall, während bei Patienten mit Metastasierung signifikant häufiger der CEA-Spiegel pathologisch wurde, pathologisch blieb oder sogar im pathologischen Bereich noch anstieg. Klarer läßt sich dieses Verhalten noch bei den 16 Patienten erkennen, bei denen Verlaufsbestimmungen über längere Zeit durchgeführt werden konnten (Abb. 23). Die 6 Patienten mit nachgewiesener Metastasierung entwickelten deutlich erhöhte CEA-Spiegel zwischen 13 und 3570 ng/ml, zum Teil nach vorübergehendem postoperativem Absinken bis zur Norm. Bei zwei Fällen war der CEA-Wiederanstieg der klinischen Diagnose um 3 bzw. um 4 Monate vorausgegangen. 8 Patienten

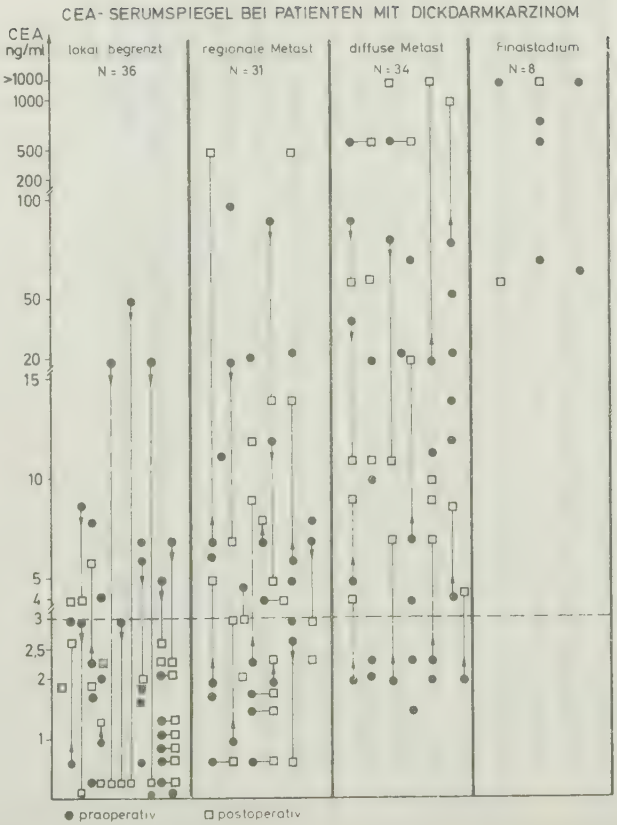


ABBILDUNG 22

POSTOPERATIVES CEA-SERUMSPIEGEL-VERHALTEN BEI PATIENTEN MIT DICKDARM-KARZINOMEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM METASTASIERUNGSGRAD

Metast.Gr.	Ø	+	++,+++	su. +	Su.
Tendenz-Gruppen					
↘ no < S 1	7	3		3	10
↘ 2		1	3	4	4
= no ↗ no 3	4	3		3	7
= 4		2	1	3	3
no ↗ + 5	2	3	4	7	9
↗++ 6		2	3	5	5
su.	13	14	11	25	38

Tendenzgruppen: 1:Spiegelabfall zur Norm bzw.unter 5ng/ml 2: Spiegelabfall im pathologischen Bereich; 3:gleichbleibender normaler bzw. im Normbereich ansteigender Spiegel; 4: im pathol. Bereich gleichbleibender Spiegel; 5:vom normalen in den pathol. Bereich ansteigender Spiegel; 6: Spiegelanstieg innerhalb des pathol. Bereichs.

TABELLE 6

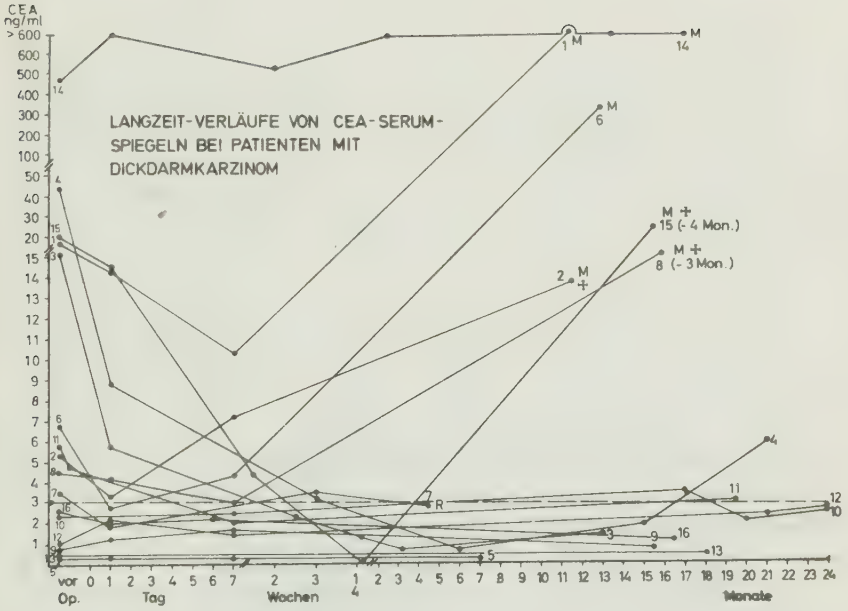


ABBILDUNG 23

ohne nachweisbare Metastasen wiesen dagegen bei allen Kontrollbestimmungen normale bzw. fast normale Spiegel auf, ebenso jedoch eine weitere Patientin trotz eines lokalen Rezidivs. Bei einer Patientin trat ein vorübergehender mäßiger CEA-Anstieg über 2 Monate auf (mehrfach kontrolliert), für den klinisch kein Grund gefunden werden konnte.

5. 2.2.2 Mammakarzinom

Abb. 24 zeigt die CEA-Spiegel bei 675 mastektomierten Frauen. Die CEA-Werte der Patientinnen ohne einen Anhalt für eine Metastasierung oder ein Rezidiv lagen zu 80,9% unter 3 ng/ml, zu 13,3% zwischen 3,1 und 5 ng/ml, zu 5,1% zwischen 5,1 und 15 ng/ml und zu 0,7% über 15 ng/ml. Die Kranken mit nachgewiesener Metastasierung dagegen wiesen nur zu 42,7% Spiegel bis 3 ng/ml auf. Bei 12,2% lagen die Werte zwischen 3,1 und 5 ng/ml, bei 21,1% zwischen 5,1 und 15 ng/ml und bei 24% über 15 ng/ml. Es erscheint hier günstiger, die Grenze zwischen normal und pathologisch bei 5 ng/ml statt bei 3 ng/ml zu setzen. Es liegen dann nur 5,8% der Gruppe ohne nachgewiesene Metastasen, jedoch 45% des Metastasenkollektivs über dieser Grenze. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist hochsignifikant: $p \ll 0{,}001$, Chi-Quadrat = 150.

Die Abhängigkeit der CEA-Spiegel von der Lokalisation der Metastasen wurde bei 197 Patientinnen untersucht. Es zeigte sich, daß die CEA-Spiegel in folgender Reihenfolge zunahmen: Lymphknoten, Haut, Leber, Lunge, Knochen, multiple Metastasierung in mehreren Organen. Statistisch erwies sich jedoch nur der Unterschied zwischen den beiden extremen Gruppen (Ln.: 36% 3, 21% 5 und 6% 15 ng/ml - multiple Met.: 71% 3, 65% 5 und 40% 15 ng/ml) als signifikant ($p < 0{,}001$).

Abb. 25 zeigt die CEA-Verlaufsbestimmungen bei 24 Patientinnen, deren Leiden sich trotz Therapie progressiv

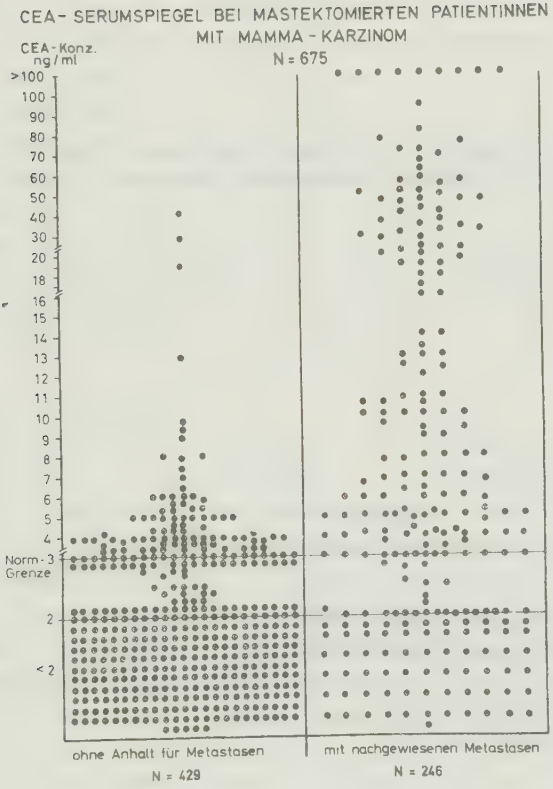


ABBILDUNG 24

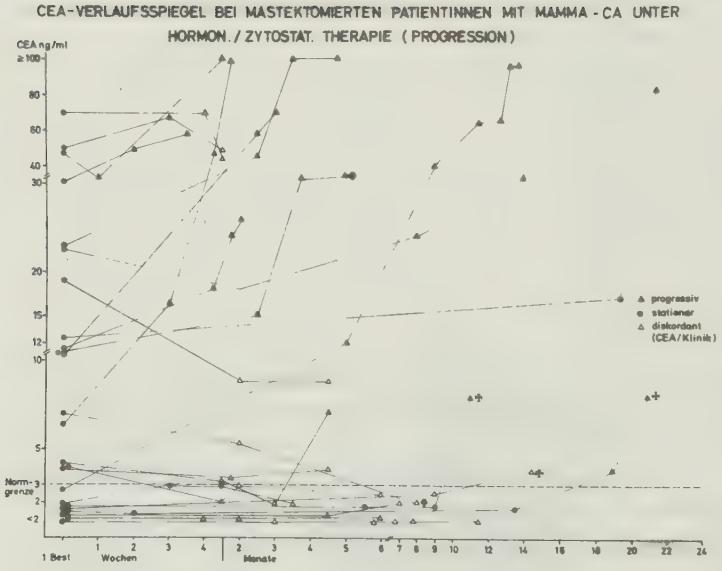


ABBILDUNG 25

verschlechterte. 12 davon zeigten übereinstimmend mit dem klinischen Verlauf eine deutliche, eine Patientin nur eine leichte Zunahme des CEA-Spiegels. In 7 Fällen blieb der CEA-Spiegel immer unter 5 ng/ml, während es in 4 Fällen sogar zu einem Absinken der CEA-Werte kam. Von den 34 Fällen mit stationärem klinischem Verlauf wiesen 5 gleichbleibend hohe und 14 gleichbleibend niedrige Spiegel unter 5 ng/ml auf. Bei 12 Fällen zeigten die CEA-Werte Schwankungen, teils mit steigender, teils mit fallender Tendenz. Die letzten 3 Fälle schließlich wiesen ein diskordantes Verhalten gegenüber der Klinik auf: Zwei fielen bis in den Normalbereich ab, während einer aus dem Normalbereich auf einen Wert von 7,5 ng/ml anstieg. 9 der 11 Fälle mit deutlicher klinischer Besserung zeigten einen CEA-Spiegelabfall von über 50% des Ausgangswertes, besonders eindrucksvoll bei zwei Beispielen mit einem Absinken der CEA-Werte von 190 und 8000 ng/ml auf weniger als 3 bzw. 65 ng/ml.

5. 2.2.3 Blasentumoren

Die Ergebnisse der CEA-Bestimmungen bei Blasentumoren sind in Abb. 26 dargestellt. Es zeigt sich, daß die CEA-Spiegel im Serum nur beim metastasierenden Blasen-und Prostatakarzinom nennenswert erhöht sind, während sie bei nur lokal wachsenden Tumoren meist normal bzw. nur leicht erhöht sind. Im Urin fanden sich dagegen bei invasiv wachsenden Karzinomen ohne Metastasen und bei Papillomen Grad III ähnlich hohe Spiegel wie beim metastasierenden Blasenkarzinom, während sie bei den übrigen Papillomtypen signifikant niedriger lagen ($p < 0,01$). Eine Einteilung in Urinproben mit unauffälligem Urinstatus und in solche mit Entzündungszeichen, mit Hämaturie oder mit beiden pathologischen Veränderungen ergab keine signifikanten Unterschiede. Bei den 90 Vergleichsbestimmungen bei Personen ohne urologische Erkrankung fanden sich vorwiegend niedrige CEA-Spiegel unter 10 ng/ml.

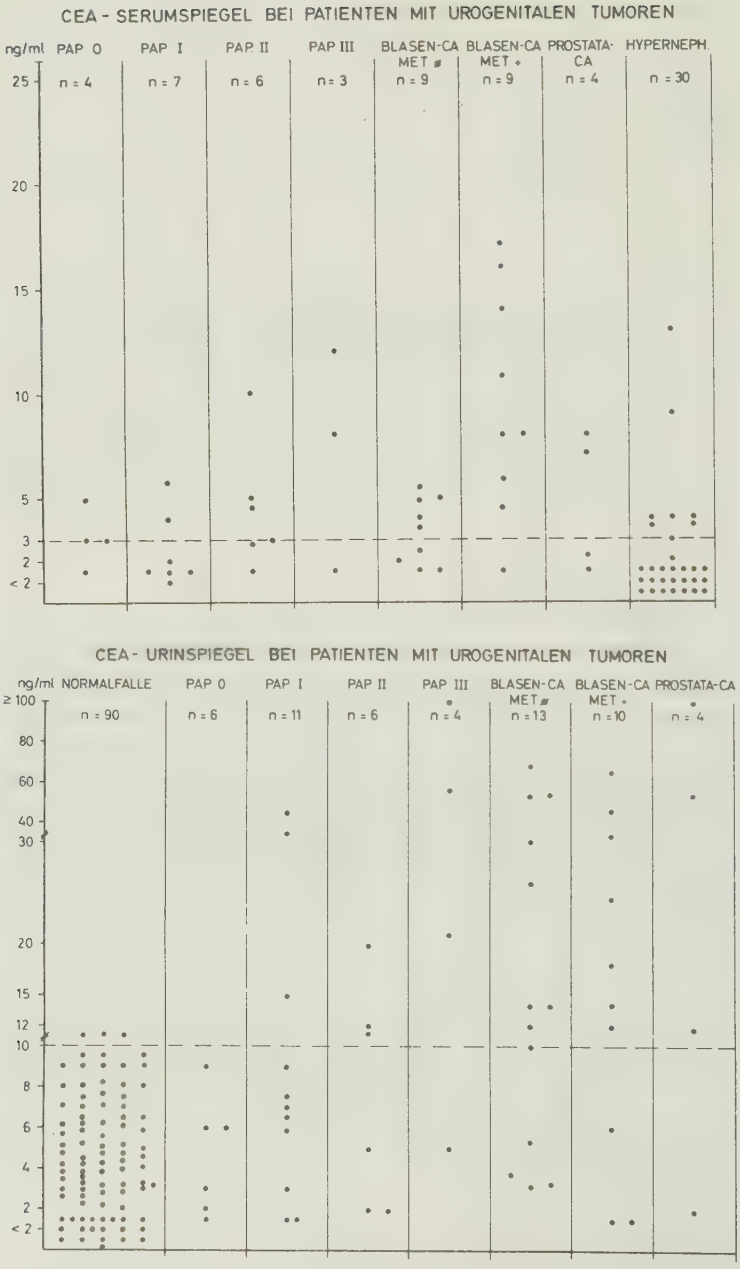


ABBILDUNG 26

5. 2.2.4 Andere Karzinome

Beim Magenkarzinom, beim Pankreaskarzinom und beim primären Leberzellkarzinom (PLC) fand sich folgende Verteilung der CEA-Spiegel:

	n	0-3,0	3,1-15,0	15,0 ng/ml
Magenkarzinom	33	15	14	4
Pankreaskarz.	18	3	8	7
PLC	16	2	12	2

Tabelle 7

5. 2.3 CEA-Spiegel bei Patienten mit nicht malignen Erkrankungen

Einen Überblick über die Ergebnisse der CEA-Bestimmungen bei verschiedenen nicht malignen Erkrankungen gibt Tab. 8:

	n	0-3,0	3,1-5,0	5,1-15,0	15,0 ng/ml
Colitis ulcerosa	14	44,4%	7,1%	28,5%	21,5%
M. Crohn	20	55%	40%	5%	0%
Hepatitis	112	54%	27%	15%	4%
Leberzirrhose	148	21,6%	40,6%	35,8%	2%

Tabelle 8

Die CEA-Verlaufsbestimmungen bei den 14 Patienten mit Colitis ulcerosa zeigt Abb. 27. Die Erstbestimmungen, die immer während eines akuten Schubs durchgeführt wurden, lagen bei 6 Patienten im Normbereich. Bei 5 Patienten waren sie leicht bis mäßig erhöht (bis 15 ng/ml) und bei 3 Patienten stark erhöht. Im Laufe der Beobachtung sanken die CEA-Werte bei 12 der 14 Patienten in den Normbereich und bei einem fast in den Normbereich ab. Nur bei einem Patienten, der klinisch das schwerste Krankheitsbild bot und schließlich an seinem Leiden verstarb, blieben die CEA-Werte mit gewissen Schwankungen deutlich pathologisch. Auch die einzige M. Crohn-Patientin, die einen CEA-Spiegel über 5 ng/ml (8 ng) aufwies, verstarb an ihrer Krankheit.

Wie erwartet, boten die Lebererkrankungen eine hohe Positivitätsrate (s. Tab. 8), wobei bei der Leberzirrhose signifikant höhere Werte auftraten als bei der Hepatitis ($p < 0{,}001$). Interessant ist auch, daß die HB_s-Antigen-positiven Patienten signifikant niedrigere CEA-Spiegel aufwiesen als negative bzw. nicht untersuchte Fälle ($p < 0{,}001$). Die Verlaufsbestimmungen bei 33 Patienten mit Hepatitis sind in Abb. 28 dargestellt. 21 davon lagen dauernd im Normalbereich, die restlichen blieben entweder mit kleineren Schwankungen im mäßig pathologischen Bereich oder sie zeigten eine Tendenz, wieder in Richtung Normalbereich abzufallen. Von den 24 Patienten mit Leberzirrhose, die länger beobachtet werden konnten, hatten nur 7 dauern normale CEA-Spiegel. Die übrigen wiesen erhöhte Werte auf, die, ähnlich wie bei der Hepatitis, im wesentlichen gleichbleibend waren. Weder bei der Hepatitis noch bei der Leberzirrhose konnte zwischen CEA- und AFP-Werten eine Korrelation festgestellt werden ($r=0{,}0075$, $N=257$). Ebensowenig ergab sich eine Beziehung zu anderen lebertypischen Parametern wie Transaminasen, Bilirubin u. ä.

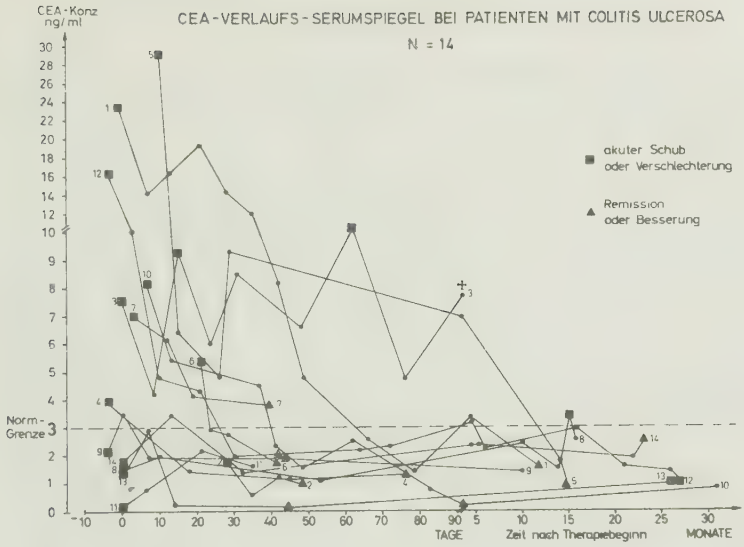


ABBILDUNG 27

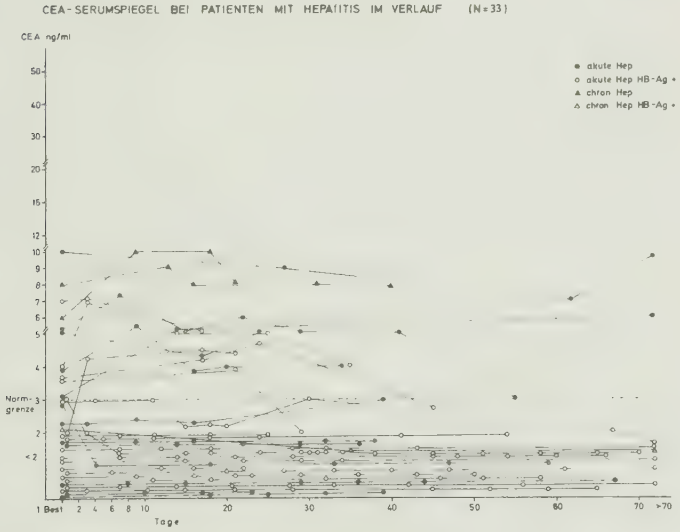


ABBILDUNG 28

5. 2.4 CEA-Spiegel bei Schwangeren und Neugeborenen

Bei 94 reifen Neugeborenen wurden normale bis mäßig erhöhte CEA-Spiegel mit einem Mittelwert von 3,8 ± 2,2 ng/ml gefunden. 36% der Werte lagen unter 3 ng/ml und 99% unter 10 ng/ml. In den Serumproben von 138 schwangeren Frauen zwischen der 15. und 42. Schwangerschaftswoche fand sich folgende Verteilung der CEA-Werte: 60% unter 3,0 ng/ml, 20% zwischen 3,1 und 5,0 ng/ ml und 10% zwischen 5,1 und 8,6 ng/ml. Der Mittelwert betrug 2,9 ± 1,8 ng/ml. Wesentlich höhere CEA-Konzentrationen wurden in Fruchtwasserproben aus der 15. - 42. SSW. ermittelt, wie in Abb. 29 dargestellt ist. Es fällt eine außerordentlich große Streuung der Werte auf. Trotzdem scheint eine gewisse Beziehung zwischen den CEA-Werten und der Schwangerschaftswoche zu bestehen. Bei einem Fall von Anenzephalus und einer Probe mit deutlicher Beimengung von Mekonium fielen hohe CEA-Werte auf, bei einem Fall von akutem Hydramnion war der CEA-Spiegel dagegen sehr niedrig.

CEA-FRUCHTWASSER-SPIEGEL IM VERGLEICH ZUR SCHWANGERSCHAFTSWOCHE (SSW)
(N = 173)

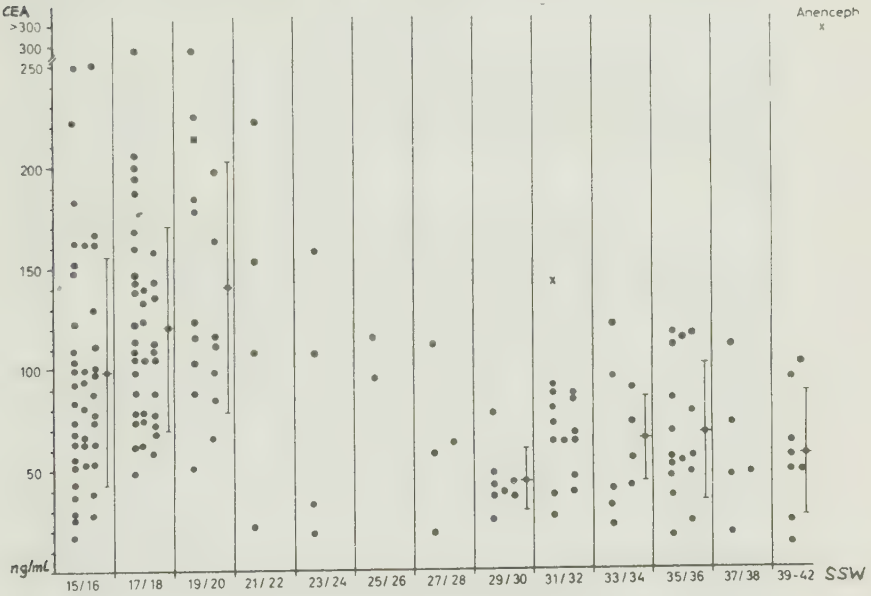


ABBILDUNG 29

6 DISKUSSION

6. 1 Methodischer Teil

6. 1.1 Gewebeextraktion und Reinigung des Antigens

Von den meisten Autoren wurde CEA aus Lebermetastasen von Dickdarmtumoren gewonnen. Bei vorliegender Arbeit konnten nur Primärtumoren verwendet werden, die nach der Literatur (86) im allgemeinen weniger CEA enthalten als Metastasen und überdies meist relativ klein waren (zwischen 5 und 100g), sodaß bis zu 30 Tumoren für eine Extraktion gepoolt werden mußten.

Nach der Originalmethode der Gruppe um GOLD (97, 98), nach der auch bei vorliegender Arbeit mit kleinen Modifikationen verfahren wurde, wird der zerkleinerte und mit einem Virtis Homogenizer homogenisierte Gewebebrei mit dem gleichen Volumen 1,2 M Perchlorsäure extrahiert. Nach einer Zentrifugation wird der Überstand gegen Leitungswasser dialysiert, nach Einengung nochmals zentrifugiert (35000 g, 30 min), gegen aqua dest. dialysiert, durch ein Bakterienfilter gepreßt und lyophilisiert. V. KLEIST (89, 91) führte die Extraktion mit 10%iger Perchlorsäure durch und fällte die Proteine nach Zentrifugation und Neutralisation mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Das Sediment wurde dann gelöst, entsalzt und lyophilisiert. Dieselbe Autorin arbeitete teilweise auch mit salinen Extrakten, die mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8,2; in 0,9% NaCl) hergestellt wurden, während RULE und GOLESKI-REILLY (156) für ihre salinen Extrakte einfache Kochsalzlösung benutzten. ROSAI et al. (154) verwendeten zur Extraktion statt Perchlorsäure Lithiumdijodosalycilat, wobei der Ertrag an CEA größer sein soll als nach der Originalmethode. Weiter wurden zur Extraktion Phytinsäure (14), Butanol (118) und Ammoniumsulfat oder Glykol (69) herangezogen.

Außer den obengenannten Autoren benutzten auch die meisten anderen (45, 61, 65, 66, 117, 124, 147, 178, 183) die Perchlorsäureextraktion, sodaß sie als die führende Methode zur CEA-Extraktion aus Tumorgewebe angesehen werden muß. Ein wesentlicher Vorteil liegt darin, daß die meisten Proteine außer einigen Glykoproteinen und geringen Mengen an Albumin ausgefällt werden. Außerdem werden bei der vielfach nachgewiesenen Komplexität des CEA die Ergebnisse besser vergleichbar, wenn die Extraktionsmethoden nicht zu unterschiedlich sind. Nach BOENISCH und RAAM (8) allerdings soll das CEA bei der Perchlorsäureextraktion in Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 40000 bis 50000 zerfallen, was aber keinen Einfluß auf den RIA haben soll. Dagegen spricht aber die Erfahrung, die in vorliegender Arbeit und von anderen Autoren (99) gemacht wurde, daß CEA bei der Gelfiltration vor und mit dem IgG (MG 160000) eluiert wird.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde, wie auch bei KLEINMAN et al. (87), eine zusätzliche Homogenisierung mit einem Pottergefäß durchgeführt. Außerdem wurde zur Einengung im Gegensatz zu den meisten anderen Autoren, die mit UM 10- bzw. PM 10-Membranen arbeiteten (21, 87), eine XM 50-Membran benutzt. Mit dieser Membran, deren Ausschlußgrenze höher liegt als die der oben genannten, konnte noch mehr niedermolekulares, inertes Material eliminiert werden und der Einengungsvorgang konnte wesentlich beschleunigt werden. Andererseits ging kein CEA verloren, wie die Prüfung des filtrierten Materials (TE II) ergab.

Bei der weiteren Verarbeitung des Tumorextraktes mit dem Ziel der Isolierung von reinem CEA versuchten die einzelnen Arbeitsgruppen eine große Zahl von Methoden:

Elektrophoretische Methoden:

Papierblockelektrophorese (97, 98), präparative Elektrophorese mit Sephadex G 25 (99) oder Agarose (91), Pevicon-Elektrophorese (87, 124), Acrylamid-Elektrophorese (34, 154) und isoelektrische Fokussierung (22, 34, 57, 70, 87, 156, 157).

Chromatographische Methoden:

Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Zellulose (139, 154) oder ECTEOLA-Zellulose (7), Gelfiltration mit Sephadex G 200 (14, 21, 34, 87, 91, 97, 98, 99, 121, 124, 167, 178, 179), Sepharose 6B (65, 66, 121, 124), Sepharose 4B (34, 70, 167, 179), Bio Rad A (34), Biogel A (154) und Amberlite (57).

Immunologische Methoden:

Affinitätschromatographie unter Verwendung von spezifischen Anti-CEA-Seren (167) oder Concanavalin A (9, 19, 153), Immunpräzipitation (61).

Fast alle Arbeitsgruppen kombinierten bei der Reinigung von CEA mehrere Methoden miteinander. KRUPEY et al. (98) aus der Gruppe um GOLD verwendeten ursprünglich als ersten Schritt eine Papierblockelektrophorese (Boratpuffer 0,05 M, pH 8,6), gefolgt von einer Gelfiltration mit Sephadex G 200 (Elution mit 0,05 M NaH_2PO_4 in 0,15 M NaCl, pH 4,5). Später (99) wechselten sie über auf eine Folge von Gelfiltration auf Sepharose 4B (CEA im 1. Peak) und Sephadex G 200 (CEA im 1. und vor allem im 2. Peak) mit abschließender präparativer Elektrophorese auf Sephadex G 25 fine. Nach der Methode der Arbeitsgruppe um HANSEN (139), nach der das CEA für den CEA-ROCHE-Test hergestellt wird, wird das CEA durch eine Folge von Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Zellulose und Gelfiltration auf Sepharose 6B und Sephadex G 200 aus dem PCA-Extrakt isoliert. TODD et al. (178) und TOMITA et al. (179) beschränkten sich auf Gelfiltration mit Sepharose 4B und Sephadex G 200, wobei TOMITA das CEA im 2. Peak der Sepharose 4B-Säule und im 1. Peak der Sephadex G 200-Säule fand. Bei der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls diese Folge von Gelfiltration verwandt, mit dem Unterschied, daß Sepharose 6B statt 4B benutzt wurde, da sich damit höhermolekulare Substanzen sauberer abtrennen ließen. Das CEA fand sich, ähnlich wie bei TOMITA, im ansteigenden Schenkel des 2. Peaks der Sepharose-Säule um im 1. Peak der Sephadex-Säule. Unterschiede in den Chromatogrammen und

in den Angaben über die CEA-haltigen Fraktionen (wie zwischen TOMITA und KRUPEY) sind leicht erklärlich, da u. U. verschiedene Tumoren völlig verschiedene Chromatogramme liefern können (157).

Obwohl die CEA-Präparation nach den beiden Reinigungsschritten in der Doppeldiffusion keine Reaktion mehr mit einem Antiserum gegen Normalextrakt zeigte (Abb. 13), erwies sich die abschließende Affinitätschromatographie als notwendig, bei der noch ein beträchtlicher Teil nicht gebundenes, immunologisch offensichtlich inertes Material abgetrennt werden konnte. Bei einem Markierungsversuch zeigte sich nämlich, daß diese Substanzen einen Großteil der Radioaktivität auf sich zogen und so die Markierung empfindlich störten.

Es herrscht Übereinstimmung darüber, daß das mit all diesen Verfahren hergestellte CEA eine starke Heterogenität aufweist, wie in vielen Untersuchungen vor allem mittels Isoelektrofokussierung (6, 22, 35, 42, 144, 157, 182, 184) gezeigt wurde. Dies veranlaßte PLOW und EDGINGTON (35, 144), mit einer Folge von Isoelektrofokussierung, DEAE-Zellulosechromatographie, Gelfiltration mit Sephadex G 200, Affinitätschromatographie mit Antiseren gegen Blutgruppensubstanzen und isopyknischer Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in CsCl eine außerordentlich homogene CEA-Präparation herzustellen, die sie CEA-S nannten. Nach ihren ersten vorläufigen Untersuchungen soll der RIA mit CEA-S wesentlich Colontumor-spezifischer sein als der mit normalem CEA. Dies wird jedoch auch bezweifelt (36).

6. 1.2 Herstellung der Antiseren

Als Antikörperbildner wurde im ersten CEA-RIA, den THOMSON et al. (177) aus der Arbeitsgruppe um GOLD entwickelten, eine Ziege verwendet. Neben einigen anderen Autoren wie z. B. EGAN et al. (40) oder MacSWEEN et al. (123) benutzte auch HANSEN (67) Ziegen zum Immunisieren, da sie seiner Meinung nach ein spezifischeres, vor allem gegen hochmolekulares CEA (MG 200000) gerichtetes Antiserum bilden, das besser im Ionen-armen Milieu reagieren würde. Anti-CEA-Seren vom Kaninchen dagegen seien unspezifischer und würden stärker mit CEA-artigen Substanzen von niedrigerem Molekulargewicht reagieren. Da aber der überwiegende Teil der Untersucher (8, 50, 87, 91, 118, 124, 130, 144, 147, 154, 167) Kaninchen verwandte , ohne daß dabei Schwierigkeiten für den RIA beschrieben wurden, wurde dieses Versuchstier auch wegen der leichteren Tierhaltung in der vorliegenden Arbeit bevorzugt.

In Tab. 9 sind die Immunisierungsverfahren einiger Untersucher zusammengestellt. In den ersten Arbeiten von GOLD und FREEDMAN (50, 51) und später vor allem zu Absorptionsstudien (87, 81, 147) wurden zur Immunisierung ungereinigte Tumorextrakte in Mengen von mehreren Milligramm verwandt. Zur Herstellung von Antiserum für den RIA benutzten alle Untersucher (8, 40, 45, 124, 130, 147, 154, 159, 167) hochgereinigte CEA-Präparationen in Mengen von wenigen Mikrogramm bis zu 1 Milligramm. Als Erstimmunisierung wurden subcutane Injektionen mit komplettem Freundschem Adjuvans bevorzugt, zur Auffrischimpfung wurden wiederholte Injektionen subcutan (50, 124, 130, 144), intravenös (154), intraperitoneal (118) oder intramuskulär (91, 159) gegeben. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Immunisierungsschema (s. S. 22), das an die Methode von HIJMANS (76) angelehnt ist, wurde von keinem anderen Unter-

IMMUNISIERUNGSSCHEMATA ZUR HERSTELLUNG VON ANTI-CEA-SERUM

Autor, Jahr (Ref.)	Spez.	Immunis.-Agens	Immun.Menge Appl.-Ort	kFA	Booster-Inj. nach	Immunis.-Dauer	Absorption
GOLD u.FREEDMAN 1965 (50)	K	TE	3mg/0,6 ml 0,1-0,2ml i.d.Fuss. + i.m.	+gl.V.		4 Wo	NE, Plasma, Darmflora-Extr. Fibrinogen
	tol. K	NE Pl.-Extr. Hb TE	10 mg Pr. 12 mg " 3 mg " 5 mg "	+gl.V.		Tage: 100-150	
PUSZTASZERI und MACH 1972 (147)	K	sal.TE PCA-TE ger.CEA Agar-Pr.	8 mg/ml (Pr) 2 mg/ml 1 mg/Inj.	+0,75ml +0,75ml			NE 20mg/ml AS Pl.0,2ml/ml AS LE 5mg/ml AS
v.KLEIST 1971 (91)	K	TE sal./RCA	25-30mg i.c. (5mg Pr.)	+	15 Tagen: gl.Menge ohne kFA +1% Al i.m. +s.c. T.15-17/ 22-24	3 Mon. bis 1 J.	
ROSAI et al. 1972 (164)	K	LIS-TE ger.CEA	1mg/ml PBS T. 1+19 s.c.	+gl.V. in 1ml s.c.	1mg/0,5ml i.v. PBS T. 54+116		LIS-NE A/B-Ery
SMITH et al. 1973 (167)	K	CEA	10 µg	+	2 Wo-Abst.		NE, Extr.:no Leber, Niere A/B-Ery,Serum 10Vol.AS-iV. Ink.1h 37°C 16h 4°C
KLEINMAN et al. 1971 (88)	K	PCA-TE	3 mg Pr. in 0,6 ml 0,2 i.Fuss. 0,4 s.c.	+	2x wchtl. über 4 Wo	über 40 T.	A/B-Rh.+Ery NE, Pl.lyoph. 0,5g 0,5g auf 50 ml AS Ink. 12h 4°C
MARTIN&MARTIN 1972 (124)	K	sal.TE CEA	200µg 0,5ml s.c.KS	+gl.V.	2x wchtl. über 4 Wo		lyoph.Plasma: 10 mg/ml AS PCA-Extr.: Milz, Magen,NE A/B/O-Ery-Stroma 500 mg/ml AS Ink. 15h 4°C
LUZZI & DEPIEDS 1972 (118)	K	Butanol-TE	1ml Ag-Susp. 1,5ml para-vertebr. 0,5 i.Fuss.	+gl.V.	wchtl.über 3 Wo,nach 3.Inj.: 1ml i.p.		Plasma:50mg/mlAS NE 40mg/mlAS A/B/O-Ery-Stroma 500mg/ml AS Ink. 15h 4°C
EGAN et al. 1972 (40)	Z	CEA	500,100,10, 1 µg subscap.				
	K	CEA	1+10 µg	+gl.V.			
SAVARIS et al. 1974 (159)	Z	CEA	1mg/0,5ml KS	+gl.V.	Serien i.m.		PCA-Extr.Leber NE, Serum
FLEISHER et al. 1973 (45)	Z	CEA	2 mg i.m.	+ 2ml	alle 3 Wo: 1 mg CEA		Serum-PCA-E: 50mg/ml AS Ink.2h 37°C, 16h 4°C
MERIADEC et al. 1973 (129)	K	CEA	100 µg	+	1 Monat: 50 µg s.c.		Extr.normale Milz, Lunge
BOENISCH&RAAM 1975 (8)	K	PCA-TE CEA	50µg/0,5ml s.c. ic.KS multipel	+gl.V.	2 wchtl. Intervall später mtl.		A/B/O-Ery lyoph. Serum PCA-Leber-Ex
PLOW&EDGINGTON 1975 (144)	K	PCA-TE (CEA-S)	600 µg Pr. hint.Fuss.	+	gl. Menge + iFA s.c.multip. 3-4 Wo-Int.	2-3 Mon	Serum,Ery-Str. A/B/O-Subst. (Schwein/Pferd) NE,no Leber-E.
Eigene Untersuch. 1974/75	K	PCA-TE ger.CEA (G200, CNBr)	ca.50mg ca.100µg i.0,5-1ml PBS	+gl.V.	7 Tagen: gl.Menge + iFA,spät. i.v.(s.Text)	8 Wo	lyoph.NS, NE, LE A/B-Ery-Rh+

TABELLE 9

sucher benützt. Es lieferte in der relativ kurzen Immunisierungszeit von 8 Wochen bei mittleren Antigenmengen starke Anti-CEA-Seren, wie die Arbeitsverdünnung der IgG-Lösung von bis zu 1:80000 zeigt.

Obwohl die zuletzt zur Immunisierung benutzte CEA-Präparation immunologisch rein war und mit einem Antiserum gegen Normalextrakt (Anti-NE Max) in der Doppeldiffusion keine Reaktion aufwies, zeigte auch unser bestes Anti-CEA-Serum eine Kreuzreaktion gegen Extrakte aus normaler Lunge und normalem Dickdarm. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das CEA-Molekül neben einer spezifischen auch eine unspezifische Antigendeterminante enthält, die mit dem NCA (nonspecific crossreacting antigen), einem in normalen Geweben vorkommenden Protein, kreuzreagiert. Zu diesem Schluß kommt auch TOMITA (179) bei seinen Untersuchungen. Er immunisierte mehrere Kaninchen und Meerschweinchen mit einer gereinigten CEA-Präparation und erhielt Antiseren, von denen eines nur mit CEA in der Doppeldiffusion reagierte. Die anderen Seren zeigten aber teils eine Kreuzreaktion und teils sogar eine Identitätsreaktion zwischen CEA und NCA.

Diese Kreuzreaktionen konnten bei der vorliegenden Arbeit durch Absorption mit Dickdarmextrakt (NE) und Lungenextrakt (LE), der sich als besonders wirkungsvoll erwies, völlig eliminiert werden. Sicherheitshalber wurde außerdem eine Absorption mit geringen Mengen an lyophilisiertem Normalserum durchgeführt. Da in der Literatur beschrieben ist, daß CEA eine gemeinsame Antigendeterminante mit der Blutgruppensubstanz A enthält (184) oder auch "reine" CEA-Präparationen mit Blutgruppensubstanzen verunreinigt sind, wurde zuletzt eine Absorption mit gewaschenen AB-Erythrozyten angeschlossen. Für die Richtigkeit dieser Maßnahme spricht, daß deutliche Agglutinationen beobachtet werden konnten, die erst nach mehrmaliger Absorption verschwanden.

Wie Tab. 9 zeigt, führten fast alle Untersucher mehr oder minder umfangreiche Absorptionen mit Normalserum bzw. Plasma (8, 50, 87, 118, 124, 144, 146, 159), mit Extrakten aus normalem Darm (50, 87, 118, 124, 144, 159, 167), Lunge (130, 147) oder Milz (124, 130) und mit AB-Erythrozyten (8, 87, 118, 144, 154, 167) bzw. mit gereinigter A- und B-Substanz (144) durch. Nur HANSEN (67) verzichtet auf Absorptionen. Er verdünnt nur das Anti-CEA-Serum mit A-Plasma, da er meint, weitere Absorptionen würden durch den Zusatz großer Mengen an Verunreinigungen mehr Probleme schaffen als nützen. Da aber bei vorliegender Arbeit in einer abschließenden Reinigung auf einer DEAE-Zellulose-Säule eine reine IgG-Lösung hergestellt wurde, konnte eine derartige Beeinträchtigung des Testes durch überschüssiges Absorptionsmaterial ausgeschlossen werden.

6. 1.3 RIA

6. 1.3.1 Markierung

Eine Übersicht über die Markierungsverfahren verschiedener Autoren gibt Tabelle 10. Von allen Untersuchern wurde CEA nach der Chloramin T-Methode von HUNTER (82) markiert. Pro µg CEA wurden zwischen 1 und 200 uCI Radioaktivität zugegeben. Der untere Extremwert von 1 µCi/ µg CEA stammt vom ersten CEA-RIA von THOMSON et al. (982). Es resultierte eine sehr geringe Empfindlichkeit des Testes, die THOMSON nur ausgleichen konnte, indem er den lyophilisierten PCA-Extrakt aus 5ml Patientenplasma in den Test einbrachte. Wird das Protein dagegen sehr großen Mengen Radioaktivität ausgesetzt, droht eine Beeinträchtigung der Immunoreaktivität. Dies könnte beim CEA-ROCHE-Test ein Grund für die kurze Haltbarkeit von nur 2 Wochen sein. Die Relation der beiden Substanzen bei vorliegender Ar-

ANGABEN ZUR JOD-MARKIERUNG DES CARCINOEMBRYONALEN ANTIGENS

Autor, Jahr (Ref.)	Jod^{125} mCi (µCi/µg)	CEA µg	Ch1.T µg	$Na_2S_2O_5$ µg	P u f f e r	R.Vol. µl	R.Zeit Sek. (µCi·Mn)/µg	Reinigung	spez. Aktiv. µCi/µg	CEA$^+$/Rö.
THOMSON et al 1969 (177)	4,0 (1-2)	2-4 mg (1)	100 (0,05;0,03)	240 (0,12;0,09)		500	60" RT (1-2)	Dialyse	0,14	200ng/ml
LoGERFO et al 1972 (115)	5,0 (10;67)	500;75 (1)	100 (0,2;1,33)	240 (0,5;3,2)	Phosph.P. 0,05M,pH 7,4	500	60" RT (10;67)	Seph.G 100		
EGAN et al. 1972 (40)	2,0 (40)	50 (1)	80 (1,6)	60 (1,2)	NaCl 0,075M Phosph. pH 7,2;0,075M	30?	120"RT (80)	Dowex Ag1-X8	20-32	22000-35000 cpm/ng
FLEISHER et 1973(45) al.	25,0 (100)	250 (1)	200 (0,8)	250 (1)			300"4°C	Sephadex G 100 (0,5 x 25cm)	50-60	0,5 ng
MARTIN & M. 1972 (124)	4,0 (80)	50 (1)	100 (2)	200 (4)		400	120"RT (160)	Sephadex G 200		25000cpm
BALI et al. 1973 (4)	1,0 (200)	5 (1)	40 (8)	45 (9)	Phosph.P. pH 7,4		60"RT (200)	Sephadex G 200 Polyacrylamid	100	10000cpm
FRANCHIMONT 1973(46)et al	1,0 (200)	5 (1)	100 (20)	240 (48)			15"RT (50)	S.G50 (1x10cm) S.G200(1x40cm)	70-125	50 µg
MERIADEC et 1973(130) al.	1,0 (200)	5 (1)	10 (2)	10 (2)	Phosphatp.		60"RT (200)	Polyacrylamid-Elektrophorese	150-200	10000cpm
Eig. Unters. 1974/75	0,2-0,6 (25-50)	5-16 (1)	50 (10;3,1)	12 (2,4;0,8)	Phosphatp. 0,5M pH 7,5 0,05M+2%BSA	70	25"RT (10-21)	S.G 50(1x20cm) S.G200(1,5x40cm)	19-31	0,6-1,5ng 20000cpm

TABELLE 10

beit, 25-50 µCi/ µg CEA, liegt deutlich über der von THOMSON, aber auch deutlich unter den höchsten, etwa der von FRANCHIMONT et al. (46). Eine Schädigung des Proteins ist nach HUNTER vor allem aber auch durch das Oxidationsmittel Chloramin T möglich. Es werden daher im allgemeinen möglichst geringe Mengen verwendet. Das Verhältnis von 3,1 bis 10 µg Chloramin T/ µg CEA bei der vorliegenden Arbeit liegt unter den Werten von FRANCHIMONT et al. (46), etwa gleich mit denen von BALI et al. (56), aber über den Angaben anderer Autoren wie von EGAN et al. (40) oder MERIADEC et al. (130). Die Relation von CEA zu Natriumbisulfit ist bei den meisten Untersuchern in etwa gleich.

THOMSON et al. reinigten das markierte CEA mit Hilfe einer Dialyse von nicht gebundenem ^{125}I. LO GERFO et al. (113) und FLEISHER et al. (45) benutzten dazu eine Gelfiltration mit Sephadex G 100, EGAN et al. (40) mit DOWEX Ag (1 - x 8) und MARTIN et MARTIN (124) mit Sephadex G 200. MERIADEC et al. (130) führten eine Polyacrylamidelektrophorese durch, die BALI et al. (4) sogar mit einer Gelfiltration mit Sephadex G 200 kombinierten. FRANCHIMONT et al. (46) schlossen an eine Entsalzung mit einer Sephadex G 50-Säule eine Gelfiltration mit einer Sephadex G 200-Säule an. Dies bietet gegenüber einer reinen Entsalzung bzw. Dialyse den Vorteil, bei einer Heterogenität des markierten CEA die immunoreaktivsten Fraktionen von dem durch Strahlung oder durch andere Faktoren geschädigten Material zu trennen. Bei der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls dieses Verfahren gewählt; die allein brauchbaren Fraktionen waren im ersten Peak der Sephadex G 200-Säule enthalten. Bei FRANCHIMONT waren es die Fraktionen mit der höchsten Count-Zahl. BALI et al. fanden die beste Bindung im 2. Peak der Acrylamidelektrophorese, während die Aktivität des 1. und 3. Peaks vom Antikörper kaum gebunden wurde. Die unterschiedlichen Befunde dürften weniger auf die unterschiedliche Strahlenbelastung zurückzuführen sein,

da die Strahlenbelastung bei FRANCHIMONT am höchsten ist. Eher dürfte es sich um eine unterschiedliche CEA-Präparation handeln. HANSEN (67) erwähnt eine Alpha-Form von CEA, die immunologisch und weitgehend auch chemisch (bis auf einen unterschiedlichen Gehalt an Sialinsäure) mit der normalen Beta-Form identisch ist, aber viel stärker markiert wird und dann viel schneller zerfällt. Falls die bei vorliegender Arbeit hergestellte CEA-Präparation mehr von diesem Material enthielte, könnte es sich beim 2. Peak der Sephadex G 200-Säule mit nicht immunoreaktivem Material um zerstörte Bruchstücke dieser CEA-Form handeln.

6. 1.3.2 Antikörperverdünnungskurve

Die von den einzelnen Autoren angegebenen maximalen Bindungen betrugen bei EGAN et al. (40) 100% bei einer Antikörperverdünnung von 1:100, bei BALI et al. (4) 89% ebenfalls bei einer Verdünnung von 1:100 und bei SMITH et al. 90%. In der vorliegenden Arbeit lagen sie bei einer Arbeitsverdünnung des 1. Antikörpers von 1:1000 (Inkubationsverdünnung 1:5000) zwischen 50 und 75%.

6. 1.3.3 Standardinhibitionskurve und Testansatz

Der CEA-Radioimmunoassay wird vor allem in drei Verfahren durchgeführt. Nach der Originalmethode der Gruppe um GOLD (177) werden die Serumproben (jeweils 5 ml) mit Perchlorsäure extrahiert, der Überstand wird lyophilisiert und der Antigen-Antikörperkomplex nach der FARR-Technik (43) mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Die von HANSEN (64) und LO GERFO (113, 115) entwickelte Z-Gel-Technik stellt als CEA-ROCHE-Test das zur Zeit verbreitetste Verfahren dar. Dabei werden die Plasmaproben ebenfalls Perchlorsäure-extrahiert, unter genauer Einhaltung von pH-Wert und Ionenkonzentration dia-

lysiert und die AG-AK-Komplexe durch Zirconylphosphatgel ausgefällt. EGAN et al. (40), die als erste auf den aufwendigen Schritt der Extraktion verzichteten, benutzten die Doppelantikörpertechnik. Sowohl die Methode von THOMSON aus der Arbeitsgruppe um GOLD (8, 45, 52, 88, 123, 124, 125, 167) als auch die Z-Gel-Technik (17, 49, 140, 146, 162) und die Doppelantikörper-Methode (4, 20, 35, 37, 45, 46, 62, 72, 123, 130, 162), die auch bei vorliegender Arbeit benutzt wurde, wurden von vielen Arbeitsgruppen übernommen bzw. modifiziert, wobei diese aber Antigen und Antikörper meist nicht selbst herstellten, sondern Substanzen von GOLD oder von der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE verwandten.

Eine große Streitfrage ist immer noch, ob es nötig ist, die Serum- bzw. Plasmaproben vor der CEA-Bestimmung mit Perchlorsäure zu extrahieren (indirekte Methode) oder nicht (direkte Methode). HANSEN (68) berichtete, er, LO GERFO und GO hätten in langen Versuchsreihen den CEA-ROCHE-Test als direkte Methode versucht und es hätte sich gezeigt, daß man damit die Antigenkonzentration in normalem Plasma nicht wirklich messen könne. Meines Erachtens beeinträchtigt das aber die Brauchbarkeit für klinische Untersuchungen nicht wesentlich, da eine geringfügige Erhöhung des CEA-Spiegels sowieso nur wenig Aussagekraft besitzt. Gegen die Extraktionsmethode sprechen vor allem der enorme Arbeitsaufwand, die hohen Kosten und bei der Z-Gel-Technik zusätzlich die Störanfälligkeit des Dialyseschrittes. Nachdem beim eigenen Test die Übereinstimmung der Werte im direkten und im indirekten Verfahren gut war, wurde auf die Extraktion verzichtet, in Übereinstimmung mit den meisten in letzter Zeit beschriebenen CEA-RIA-Methoden.

Einen Überblick über die Einzelheiten der verschiedenen Radioimmunoassays gibt Tabelle 11.

Einen der wichtigsten Parameter stellt die Menge des eingesetzten markierten Proteins dar. Sie bestimmt wesentlich die Empfindlichkeit des Systems und sollte daher so

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG DES CARCINOEMBRYONALEN ANTIGENS
METHODEN - ÜBERSICHT I

Autor, Jahr (Ref.)	Mark. Menge mCi;mg (µCi/µg)	spez. Aktiv. µCi/µg	BK %	Messbereich ng/ml	An.	Extr.	Co-Präz.	Analys Menge ml	RIA t Tage	Norm-grenze ng/ml
THOMSON et al. 1969 (179) +	4;2-4 (1-2)	0,14	45-50	2,5-320	S	PCA 1M	AS	5	5	2,5
HANSEN et al. 1971 (64) ++					P	PCA 1M	ZG	5	2	2,5
Lo GERFO et al. 1971 (113) ++			75	- 20	S/P	PCA 0,8M	ZG	5	2	2,5
Lo GERFO et al. 1972 (115) ++	5;0,5 (10) 5;0,075 (67)		70	1,5-10(20)	P	PCA 0,8M	ZG	2	2	
Go et al. 1972 (48) ++					P	Ø	ZG	0,1	2	2,0
EGAN et al. (TODD) 1972 +++ (40,71,178)	2;0,050 (40)	20-32	30-40	3 - 70 (1 - 100)	G S	Ø	2.AK	0,2	1	2,5
LAURENCE et al. 1972 (108) +++					P	Ø	2.AK	0,2	2	12,5
MARTIN et al. 1972 (124,125)+	4;0,050 (80)				S	IK	AS	5	4	4
MAC SWEEN et al. 1972 (123)+++,+		22-50	30	3 - 100	S S	Ø PCA	2.AK AS	0,025 0,4	3 2	10, 3,0
KLEINMAN&TURNER 1972 (88) +				2 - 100	S	PCA	AS	5	5	2,8
MACH et al. 1973 (120) +			50-60		P	PCA	AS	2	3	5,0
BALI et al. 1973 (4)	1;0,005 (200)	100	50	5 - 640	S S	Ø Ø	FP1. 2.AK-S	0,1 0,1	2 2	10,0
FRANCHIMONT et al. 1973 (46)	1;0,005 (200)	70-125		0,5-100	S	Ø	2.AK	0,05	6	7,0
MERIADEC et al. 1973 (130)	1;0,005 (200)	150-200		2,5 - 320	S/P	PCA Ø	2.AK fix.Z.	0,05	2	5,0
SMITH et al. + 1973 (167,168)				0,5 - 32	S/P S/P	PCA Ø	AS AS	1,0 0,1	2	1,3 2,5
MC PHERSON et al 1973 (128)		10-20	50		S/P	Ø	FP	1	5	2,5
FLEISHER et al. 1973 (45) ++ +++	2,5;0,25 (100)	50-60	30-40 50-70 40	0 - 100 0 - 25 0,5- 20	S P S	PCA PCA Ø	AS ZG 2.AK	5 1 0,2	6 2 1	2,5 2,5 12,5
BOENISCH&RAAM + 1975 (8)		500		4 - 256	S/P	PCA	AS	5	2	10,0
EDGINGTON et al. 1975 (35)			55	6 - 90 E	S	Ø	2.AK	0,33	2	14 E
ROCHE-Test ++ dir.				0 - 20	P P	PCA Ø	ZG ZG	0,5	2	2,5
Eig. Unters 1974/75	0,4-0,6; 5-16 (25-50)	14-31	25-35	1,5-160	S/P S/P	PCA Ø	2.AK 2.AK	0,5 0,2	4 3	3,0

TABELLE 11

gering wie möglich sein. Andererseits muß die Radioaktivität hoch genug sein, um durch ausreichende Unterschiede in den Count-Zahlen eine exakte Messung zu ermöglichen, aber nicht so hoch, daß das Protein geschädigt wird. Die bei der vorliegenden Arbeit eingesetzte Aktivität von 15000 bis 25000 cpm/Röhrchen ist mit den Werten der meisten Untersucher (4, 45, 115, 120, 124, 130) gut vergleichbar, liegt aber deutlich unter der des CEA-ROCHE-Tests (90000 cpm). Die eingesetzte Tracermenge von 0,6 - 1,5 ng ist in etwa übereinstimmend mit der von EGAN et al. (40) und FLEISHER et al. (45), ist etwas höher als bei EDGINGTON und PLOW (35) und etwas niedriger als bei SMITH et al. (167), KLEINMAN et al. (88) und beim CEA-ROCHE-Test, jedoch deutlich niedriger als bei THOMSON et al. (177). Da es aber keinen einheitlichen Standard für CEA gibt und das markierte Protein aus verschiedenen Präparationen stammt, sind die angegebenen Werte nur bedingt vergleichbar.

Mehrere Autoren benutzten als 1. Antikörper Ziegen-anti-CEA-Serum in einer Arbeitsverdünnung von 1:1600 bis 1:40000 (45, 40, 115, 120, 177), andere Kaninchenserum in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:50000 (4, 46, 88, 130, 167). Da das bei der vorliegenden Arbeit benutzte Anti-CEA-Serum nach der Reinigung auf der DEAE-Zellulose-Säule etwa um den Faktor 10 eingeengt wurde, entspricht die Arbeitsverdünnung der IgG-Lösung von 1:80000 einer wirklichen Verdünnung des Vollserums von etwa 1:8000.

Die mit dieser Verdünnung angestrebte Bindungskapazität von 25-35% stimmt etwa mit den Angaben von EGAN et al. (40) und MARTIN et al. (124) überein und liegt unter der Angabe von EDGINGTON et al. (35) (55%). Für die Ammoniumsulfatmethode empfiehlt THOMSON (177) einen Wert von 45-50%, während LO GERFO bei der Z-Gel-Technik mit einer hohen Bindungskapazität von 70% arbeitet (113). Die untere Empfindlichkeitsgrenze der verschiedenen CEA-RIA-Systeme liegt zwischen 0,5 und 5 ng/ml, wobei die hochempfindli-

chen Teste meist einen relativ kleinen Meßbereich haben, der CEA-ROCHE-Test z. B. einen Bereich von 0,5 bis 20 ng/ml. Alle Proben mit einem Wert über 20 ng/ml müssen dann im direkten Test wiederholt werden. Der bei der vorliegenden Arbeit entwickelte RIA weist eine Empfindlichkeit bis etwa 2 ng/ml auf bei einem Meßbereich bis 160 ng/ml. Das ist von Vorteil bei Studien über Karzinompatienten, wo häufig sehr hohe Werte auftreten. Die exakte CEA-Bestimmung von Seren im Normalbereich ist dagegen nicht mehr möglich.

Ein großes Problem beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen ist die Verwendung unterschiedlicher Standardpräparationen, wodurch etwa mit dem Test der französischen Firma CEA höhere Werte erhalten werden als mit dem ROCHE-Test. EDGINGTON et al. (35) geben sogar die CEA-Werte nicht in ng, sondern in Units an. Da es keine international gültige Präparation gibt, wurde der beim eigenen Test verwendete Standard an dem der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE geeicht, da der Test dieser Firma die größte Verbreitung gefunden hat.

Der CEA-RIA kann offensichtlich auch bei hoher Spezifität leicht durch unspezifische Faktoren gestört werden. Daher verwandten alle Arbeitsgruppen große Sorgfalt darauf, Standard- und Analysenproben den gleichen Bedingungen auszusetzen. MACH et al. (120) etwa setzten den Standardproben genau die Menge der Analysenprobe (2 ml) an CEA-freiem Normalplasma zu und extrahierten beide in gleicher Weise. Ähnlich arbeiteten neben anderen auch BOENISCH und RAAM (8) oder FLEISHER et al. (45), die ebenfalls indirekte Testverfahren durchführten. Bei fast allen direkten Testverfahren wird wie bei der vorliegenden Arbeit dem Standard die volle Analysenmenge normales, CEA-freies Humanserum bzw. - Plasma zugesetzt. Die einzige Ausnahme findet sich bei LAURENCE (Verwendung von Puffer statt Normalserum), der aber einen Normalbereich bis 12,5 ng/ml angibt (108). Dies stimmt mit den eigenen Beobachtungen überein, nach denen in Normalseren bei Verwendung von Standards ohne Serumzusatz im RIA CEA-Werte von 10 - 12 ng/ml

gefunden wurden.

Beim Vergleich der Durchführung der verschiedenen Radioimmunoassays fällt auf, daß die meisten Arbeitsgruppen ausgiebige Vorinkubationen vor Zugabe des markierten Proteins für nötig halten. Sie ist beim CEA-ROCHE-Test genauso lang wie die eigentliche Inkubation, nämlich 30 min bei 45°C. Bei dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Test beträgt sie 7 Stunden bei 37°C, bei MARTIN et al. (124) sogar 14 Stunden bei 37°C. Zusammen mit der Hauptinkubation und bei Doppelantikörpertesten mit der 2. Inkubation liegt die Gesamtdauer der Teste zwischen wenigen Stunden wie bei EGAN et al. (40) und 5 Tagen wie bei der Originalmethode von THOMSON et al. (177). Rechnet man die Perchlorsäure-Extraktion nicht mit, so benötigt der CEA-ROCHE-Test mit etwa 2 Stunden am wenigsten Zeit. Dafür können wegen des kurzen Intervalls zwischen den einzelnen Arbeitsgängen nur jeweils 18 Analysenproben in einem Testansatz untersucht werden. Bei dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Test steht dem Nachteil der langen Testdauer der Vorteil gegenüber, daß in einem Arbeitsgang über 100 Bestimmungen gemacht werden können.

6. 1.3.4 Vergleich zwischen verschiedenen CEA-Assays

Erst relativ wenige Arbeitsgruppen untersuchten eine größere Anzahl von Analysenproben mit verschiedenen CEA-Testen, um so einen direkten Vergleich anzustellen. Nach einer Untersuchung der Arbeitsgruppe um ZAMCHEK (136) fand sich zwischen dem Z-Gel-Assay von HANSEN und dem Ammoniumsulfat-Assay von THOMSON bei 568 Proben eine qualitative Übereinstimmung zwischen 83 und 86% (unter 2,5 ng/ml: normal, über 2,5 ng/ml: pathologisch). LAURENCE et al. (108) bestimmten 272 Blutproben sowohl mit ihrem Doppelantikörpertest als auch mit der Z-Gel-Technik und kamen auf

eine qualitative Übereinstimmung von 72%. Bei der bisher größten Untersuchung dieser Art (132) wurden 531 Proben nach dem THOMSON-Assay im Zentrallabor in Montreal und in 3 weiteren Universitätszentren in den USA und in England untersucht. Obwohl der Test von in Montreal ausgebildeten Laborantinnen mit den gleichen Chargen durchgeführt wurde, ergab sich überraschenderweise auch hier zwischen dem Zentrallabor und der Summe der anderen Labors nur eine qualitative Übereinstimmung von 72%. Wurden vier Bereiche gebildet (0 - 2,5; 2,6 - 5,0; 5,1 - 10,0; über 10,0 ng/ml), so sank die direkte Übereinstimmung auf 62,1%. Gemessen an diesen Ergebnissen fiel der Vergleich des eigenen Tests mit fremden Assays zufriedenstellend aus. Mit dem CEA-ROCHE-Test fand sich eine qualitative Übereinstimmung von 81% und bei Aufteilung auf 7 Bereiche eine direkte Übereinstimmung von 57% (N = 81). Gegenüber dem Test der Firma IDW betrug die Konkordanz sogar 93% bei 142 Seren. Auch die Korrelationskoeffizienten waren bei beiden Vergleichen hoch. (Näheres s. Abschnitt Ergebnisse S. 38)

6. 2 Klinischer Teil

6. 2.1 Normalwerte

Da bei den einzelnen Arbeitsgruppen zum Teil sehr verschiedene Standardpräparationen zum Einsatz kamen und die Testverfahren ebenfalls große Unterschiede aufwiesen, ist es verständlich, daß die angegebenen Normalgrenzen nicht einheitlich sind. Bei der bisher größten Studie (68), die mit dem CEA-ROCHE-Test durchgeführt wurde, fanden sich bei 892 gesunden nichtrauchenden Personen zu 97% Plasmaspiegel unter 2,5 ng/ml, zu 2,7% zwischen 2,6 und 5,0 ng/ml und zu 0,3% über 5 ng/ml, während sie bei 620 gesunden Rauchern nur zu 81% unter 2,5 ng/ml lagen. Im CEA-ROCHE-Test setzte man aufgrund dieser Befunde die Grenze für Normalwerte bei 2,5 ng/ml fest. Dabei wurde ausdrücklich festgestellt, daß dies eine willkürliche Grenze ist, bei der einer relativ geringen Zahl von falsch negativen Resultaten bei Tumorpatienten eine relativ geringe Zahl von falsch positiven Resultaten bei gesunden Personen gegenübersteht. Auch THOMSON et al. (177) und die meisten anderen Autoren wählten einen Normalbereich bis 2,5 ng/ml. Da bei der eigenen Untersuchung 60 gesunde Rekruten CEA-Werte bis 3 ng/ml aufwiesen, wurde hier die Normalgrenze gesetzt. Höhere Normalbereiche wie bei EDGINGTON et al. (35) von 14 U zu 0,64 ng/ml und beim Test der französischen Firma CEA (10 ng/ml) dürften auf unterschiedlichen Standardpräparationen beruhen, während der Grund bei LAURENCE (108) (12,5 ng/ml) vor allem darin liegen dürfte, daß bei einem direkten Test dem Standard kein Normalserum zugesetzt wird.

6. 2.2 Patienten mit malignen Erkrankungen

Tabelle 12 zeigt eine Sammelstatistik über den Anteil pathologischer CEA-Werte bei verschiedenen malignen Erkrankungen.

6. 2.2.1 Dickdarmkarzinom

In der ersten Veröffentlichung über einen CEA-RIA durch THOMSON et al. (177) wurde die Hoffnung geweckt, endlich einen einfachen und sicheren Krebstest zur Verfügung zu haben. 35 (97%) der Fälle mit Dickdarmkrebs hatten einen erhöhten CEA-Spiegel, während alle Proben, die nicht von Krebspatienten stammten, im Normalbereich unter 2,5 ng/ml lagen. Diese Ergebnisse konnten jedoch in späteren Untersuchungen nicht bestätigt werden. LO GERFO et al. (116) fanden in 86% und REYNOSO et al. (151) in 83% der Fälle mit Dickdarmkarzinom erhöhte CEA-Spiegel, während es in der CEA-ROCHE-Studie, der bisher größten Untersuchung (68), bei 544 Fällen nur noch 72,4% waren. Für die Frage, inwieweit der CEA-Test ein Hilfsmittel für die Diagnostik sein kann, sind die CEA-Spiegel vor der Operation entscheidend, die aber nur von wenigen Autoren gesondert angegeben werden. Sie waren bei ZAMCHEK (192) nur zu 59% pathologisch, während die Positivitätsraten bei fortgeschrittenen, metastasierenden Karzinomen 96% und bei beiden Gruppen zusammengenommen 72% betrugen. Bei einer gemeinsamen Studie Canadian National Cancer Institute und der American Cancer Society (131, 132) erwiesen sich 62% aller präoperativen Werte als pathologisch. Bei den eigenen Untersuchungen wurden präoperative CEA-Bestimmungen bei 92 Patienten durchgeführt. Mit einer Positivitätsrate von 56,5% war das Ergebnis mit den obengenannten gut vergleichbar.

POSITIVITÄTSRATEN DER CEA-SERUM/PLASMA-SPIEGEL BEI PATIENTEN MIT MALIGNEN ERKRANKUNGEN (SAMMELSTATISTIK)

Diagnose	Anzahl	Pos.-R.(%)	Referenz
Dickdarm-karzinom	3285	71%	4,5,10,24,28,29,32,33,48,49, 64,68,88,108,110,113,116,120, 122,123,125,127,128,131,133, 134,135,140,149,150,151,162, 166,167,177,190
Magen-karzinom	338	45%	5,10,48,68,108,113,125,131, 149,150,151,162,166
Pankreas-karzinom	225	80%	5,10,24,29,48,68,85,102,120, 125,131,133,134,135,141,151, 162,166
Bronchial-karzinom	854	74%	5,10,24,25,28,46,48,68,85,102, 115,120,123,129,131,134,151, 186
Mamma-Karzinom	667	54%	5,10,18,23,24,28,46,48,68,85, 102,120,123,125,129,131,134, 151,167,171
Blasenkarz.	111	28%	10,113,125,151,152
Ovarialkarz.	51	31%	5,10,28,113,125,131,151,167
Mal. Melanom	46	50%	28,129,167
Hepatom	32	69%	85,113,131,151

TABELLE 12

Von den pathologischen Werten entfällt noch ein Teil auf mäßige Erhöhungen des CEA-Spiegels ohne wesentliche Aussagekraft, sodaß der CEA-Test nur in Ausnahmefällen ein relevantes Hilfsmittel für die Diagnostik beim Dickdarmkarzinom darstellt, zumal zuverlässigere Methoden zur Verfügung stehen (Endoskopie, Röntgen). Darüber herrschte allgemein Übereinstimmung, bis durch den CEA-S-Test von EDGINGTON et al. (35) die Diskussion wiederauflebte. Sie berichteten über eine hohe Positivitätsrate (80%) bei Karzinomen des Verdauungstrakts, während die Spiegel bei nicht malignen Erkrankungen fast durchgehend normal waren. ZAMCHEK (36) wandte dagegen ein, daß die hohe Spezifität möglicherweise auf eine höhere Normgrenze und auf ein Überwiegen von fortgeschrittenen Krebsfällen im Patientengut zurückzuführen sei. Er forderte daher weitere Untersuchungen vor allem mit einer genauen Angabe des Ausbreitungsstadiums der Erkrankung. Eine solche Untersuchung wurde bis heute nicht veröffentlicht.

Eine Beziehung zwischen der Tumorausbreitung und der Höhe des CEA-Spiegels wird von allen Autoren angenommen. LO GERFO et al. (116) fanden im Stadium DUKES A 38% Erhöhungen, bei DUKES B 60%, bei DUKES C 75% und bei DUKES D 85%. Bei MACH et al. (122) betrugen die entsprechenden Zahlen: 58%, 68%, 71% und 81%, bei LIVINGSTONE et al. (112): 14%, 54%, 60% und 80%, bei vorliegender Arbeit: 33% (DUKES A+B), 59% und 76%. Es erwies sich dabei nur der Unterschied zwischen Tumoren mit und ohne Fernmetastasierung als signifikant, nicht jedoch der zwischen Tumoren mit und ohne regionale Lymphknotenmetastasen. HOLYOKE et al. (80, 81) glauben, schon vom präoperativen CEA-Spiegel Rückschlüsse auf die Prognose ziehen zu können. Von 20 Fällen ihrer Stuide, die schon vor der Operation normale Werte aufwiesen, entwickelte nur einer später Metastasen, dagegen 5 der 7 Patienten, die vor der Operation

stärker erhöhte Werte von mehr als 7 ng/ml hatten. Da aber nach anderen Untersuchungen (s.o.) ein größerer Teil der Patienten mit Metastasen normale CEA-Spiegel zeigt, muß man mit einer derartigen Interpretation vorsichtig sein.

Das größte klinische Interesse haben bis jetzt die postoperativen CEA-Verlaufsbestimmungen bei Patienten mit Dickdarmkarzinom gefunden. LO GERFO et al. (116) bestimmten den CEA-Spiegel bei 27 Patienten vor der Operation und in 2-tägigen Abständen nach der Operation. Es zeigten sich vier verschiedene Verhaltensweisen der CEA-Spiegel: Bei 7 Patienten waren die CEA-Werte vor und nach der Operation normal. Bei weiteren 7 Patienten fielen sie prompt innerhalb von 2-4 Tagen in den Normbereich, bei 8 Fällen dagegen mit einer Verzögerung von 10 bis 17 Tagen. Bei den 5 Patienten mit nachgewiesener Metastasierung blieben die pathologischen Werte bestehen. MACH und Mitarbeiter (84, 122) untersuchten 45 Patienten, bei denen nach dem klinischen Anschein der Tumor völlig entfernt worden war. 2-4 Wochen nach der Operation lagen die CEA-Werte bei 40 Fällen im Normbereich (Normgrenze bei MACH: 5 ng/ml). Bei den übrigen 5 Patienten wurde später auch klinisch eine Metastasierung nachgewiesen. Von den 19 Patienten mit bekannter Metastasierung dagegen blieben 11 im pathologischen Bereich über 5 ng/ml, 2 fielen in den Normalbereich ab, während 6 vorher wie nachher normale Werte aufwiesen. Bei längerer Beobachtung über mehrere Monate zeigte sich bei 3 der oben erwähnten, anscheinend metastasenfreien Patienten eine deutliche, zunehmende CEA-Erhöhung, der nach 2,5 bis 10 Monaten der klinische Nachweis einer Metastasierung folgte. Bei 6 Patienten folgte dem prompten, postoperativen CEA-Spiegelabfall ein langsamer Wiederanstieg über Monate, ohne daß der sichere Nachweis einer Metastasierung geführt werden konnte. Bei den übrigen, klinisch unauffälligen Patien-

ten blieben die CEA-Spiegel, bis auf einige Ausnahmen mit kleinen Schwankungen, immer im Normbereich. SOROKIN und SUGARBAKER (169) führten eine prospektive Studie mit 102 Patienten durch, die an einem Dickdarmkarzinom operiert worden waren und klinisch keinen Anhalt für eine Metastasierung boten. Bei den 6 Patienten, die ansteigende pathologische Werte aufwiesen, fanden sich später Metastasen. 6 weitere Patienten hatten geringe, gleichbleibende CEA-Spiegelerhöhungen, 3 davon mit einer Lebererkrankung, und 6 Patienten schließlich hatten vorübergehende Erhöhungen, alle ohne Metastasen. HERRERA et al. (73) führten bei 46 Patienten, die klinisch ebenfalls keinen Anhalt für eine Metastasierung boten, präoperative und regelmäßige postoperative CEA-Kontrollen durch. Die Beobachtungszeit betrug bei den Patienten ohne Rückfall mindestens 14 Monate (durchschnittlich 25 Monate). Bei 23 Kranken ließen sich später klinisch Metastasen oder Rezidive nachweisen, wobei die CEA-Erhöhung in 14 Fällen der klinischen Diagnose um mindestens 3 Monate (durchschnittlich 5 1/2 Monate) vorausging. 3 Patienten wiesen trotz Metastasen keine CEA-Erhöhung auf, darunter sogar einer, der präoperativ einen hohen CEA-Spiegel hatte. Von den 23 wahrscheinlich geheilten Patienten hatten 13 dauernd normale Werte, 4 zwischenzeitlich einen einzelnen pathologischen Wert, 4 längere vorübergehende CEA-Erhöhungen und 2 dauernd erhöhte CEA-Spiegel. Für die beiden letzten Fälle gibt HERRERA als mögliche Erklärung für den einen starkes Rauchen und für den anderen eine Lebererkrankung an. In einer anderen Veröffentlichung berichteten HERRERA et al. (74) auch über CEA-Bestimmungen bei 131 Kranken, die wegen fortgeschrittener Dickdarmkarzinome zytostatisch oder radiologisch behandelt wurden. Die 9 Patienten, bei denen es unter der Therapie zu einer deutlichen Tumorregression kam, zeigten fallende

oder gleichbleibend niedrige CEA-Werte, während 80% der Patienten mit Tumorprogression steigende CEA-Spiegel aufwiesen. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten RAVRY et al. (148), SUGARBAKER et al. (172) und HOLYOKE et al. (81).

Bei den eigenen Untersuchungen konnten bei 50 Patienten prä- und postoperative CEA-Bestimmungen durchgeführt werden. Es zeigte sich in Bezug auf die Metastasierung ein hochsignifikanter Unterschied ($p \ll 0{,}001$) zwischen den Patienten, deren CEA-Spiegel in den Normbereich abfiel bzw. normal blieb, und denen, die gleichbleibend hohe, steigende oder nur geringfügig innerhalb des pathologischen Bereichs abfallende Werte aufwiesen. Bei allen 18 Patienten der erstgenannten Gruppe wurde zum Zeitpunkt der Operation ein lokal begrenzter Tumor bzw. nur eine regionale Lymphknotenmetastasierung festgestellt, während von den 32 Kranken der 2. Gruppe nur in einem Fall der Tumor lokal begrenzt war, bei 9 Fällen regionale Lymphknotenmetastasen und bei 14 Fällen bereits Fernmetastasen vorlagen. Dieser Unterschied wird noch klarer bei den Langzeitverlaufsbestimmungen, die bei 16 Patienten durchgeführt werden konnten (s. Abb. 31). Bei allen 6 Patienten, die von Metastasen befallen wurden, zeigten sich zunehmend pathologische Werte, in 4 Fällen nach einem vorübergehenden CEA-Spiegelabfall in oder fast in den Normalbereich. In 2 Fällen ging der Verdacht auf eine Metastasierung aufgrund des CEA-Wiederanstiegs dem klinischen Nachweis um 3 bzw. 4 Monate voraus. Ein lokales Rezidiv ging dagegen nicht mit einer CEA-Spiegelerhöhung einher. Von den 9 Patienten, die bislang keinen Anhalt für ein Rezidiv oder Metastasen boten, hatten 8 nach der Operation normale bzw. grenzwertige CEA-Spiegel, z. T. mit kleinen Schwankungen. Bei einer Patientin trat 21 Monate nach der Operation ein in mehreren Kontrollen bestätigter, vorübergehender CEA-Spiegel-Anstieg in den mäßig pathologischen Bereich auf, für den kein Grund gefunden werden konnte.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich unter Berücksichtigung der oben dargestellten und anderer Untersuchungen (3, 10, 105, 106, 109, 112, 129, 164, 170, 177, 190, 191, 192) folgende Schlüsse ziehen:

Bleibt nach der Operation ein Abfall des CEA-Spiegels zur Norm aus, so spricht das für eine unvollständige Tumorentfernung. Bei einem Teil der Fälle, vor allem bei solchen mit mäßig pathologischen, über längere Zeit gleichbleibenden CEA-Werten, scheint jedoch kein Rückfall vorzuliegen. Bleiben die CEA-Werte nach einem postoperativen Spiegelabfall über längere Zeit normal, so spricht das für eine vollständige Tumorentfernung, steigen sie dagegen wieder deutlich an, so liegt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv oder eine Metastasierung vor. Der CEA-Anstieg scheint dabei oft der klinischen Nachweisbarkeit um mehrere Monate vorauszugehen. Es wurden jedoch auch leichte vorübergehende CEA-Spiegel-Erhöhungen ohne Bedeutung beobachtet und mäßige, langsam progrediente Erhöhungen längere Zeit nach der Operation, deren Wertigkeit noch nicht einzuschätzen ist. Andererseits kommt es bei manchen Patienten auch bei fortgeschrittener Metastasierung nicht zu einem Anstieg des CEA-Spiegels, in einem beschriebenen Fall sogar bei einem Patienten mit einem hohen präoperativen CEA-Wert.

Insgesamt herrscht Übereinstimmung darüber, daß der CEA-Test bei vorsichtiger Beurteilung gut zur postoperativen Verlaufskontrolle von Dickdarmkarzinomen geeignet ist. Eine genaue Einschätzung seiner Wertigkeit wird sich aber erst nach wesentlich größeren Verlaufsstudien, als sie zur Zeit vorliegen, geben lassen.

6. 2.2.2 Mammakarzinom

Nach einer Sammelstatistik, die 5 Studien berücksichtigt (18, 113, 120, 152, 171), ergibt sich beim Mammakarzinom folgende Verteilung der CEA-Werte:

	0-2,5	2,6-5,0	5,1-10,0	10 ng/ml
N = 367	42%	19%	15%	24%

Die eigenen Befunde stimmen damit gut überein:

	0-3,0	3,1-5,0	5,1-15,0	15,0 ng/ml
N = 246	42,7%	12,2%	21,1%	24,0%

Gerade weil in letzter Zeit der Trend zu frühzeitiger zytostatischer Behandlung geht, ist es von großem klinischem Interesse, ob der CEA-Test einen Beitrag zur Erfassung einer eingetretenen Metastasierung leisten kann. TORMEY et al. (180) fanden bei 74% von 72 mastektomierten Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom erhöhte CEA-Spiegel. Durch Hinzunahme von 2 weiteren Parametern, HCG und N_2N_2-Dimethylguanosin, erhöhte sich die Positivitätsrate auf 97%. Auch bei 68% von Patientinnen ohne nachweisbare Fernmetastasen, bei denen jedoch im Operationspräparat histologisch eine Aussaat in die regionalen Lymphknoten festgestellt worden war und damit eine okkulte Fernmetastasierung nicht unwahrscheinlich war, fielen einer bzw. mehrere dieser Teste pathologisch aus. Ein Nachteil dieser Studie liegt jedoch darin, daß sie keine genauen Angaben über falsch positive Resultate macht.

Bei den eigenen Untersuchungen fand sich ein hoch-

signifikanter Unterschied ($p \ll 0{,}001$) zwischen einem Kollektiv von 246 mastektomierten Patientinnen mit nachgewiesener Aussaat und einer Gruppe von 429 Frauen ohne einen Anhalt für eine Metastasierung oder ein Rezidiv. 55% der ersten, jedoch nur 5,8% der zweiten Gruppe wiesen CEA-Spiegel über 5 ng/ml auf. Da sich bei letzteren aber auch stärker erhöhte Werte fanden, würde sich der CEA-Test nur dann als ein wirklich effektives Hilfsmittel für die Diagnostik erweisen, wenn bei einem größeren Teil dieser erhöhten Werte bei längerer Beobachtung eine Metastasierung nachweisbar würde.

CHU et al. (18) berichteten, daß die Lokalisation der Metastasen einen Einfluß auf die Höhe des CEA-Spiegels habe. Bei einer Gesamtzahl von 83 Fällen ermittelten sie für 93% der Fälle mit Lebermetastasen, bei 83% der Lungen- und bei 64% der Knochenmetastasen, jedoch nur bei 41% der Weichteilmetastasen pathologische CEA-Spiegel. Bei der eigenen Untersuchung fanden sich bei 197 Patientinnen vergleichbare Zahlen für Weichteil- und Knochenmetastasierung (38%, 56%), jedoch deutlich niedrigere Werte für eine alleinige Aussaat in Leber und Lunge (38%, 50%). Bei Befall mehrerer Organe betrug der Wert 71%.

Im Gegensatz zum Dickdarmkarzinom gibt es erst relativ wenige Untersuchungen, inwieweit CEA-Verlaufsbestimmungen zur Therapiekontrolle beim Mammakarzinom geeignet sind. CHU et al. (18) bestimmten bei 32 Patientinnen mit Mammakarzinom die CEA-Spiegel vor Therapie (Ablatio, Chemotherapie, Hormontherapie) und dann über einen Zeitraum von bis zu 27 Monaten nach bzw. während der Therapie. Sie fanden, daß bei allen 5 Patientinnen mit deutlichem Therapieerfolg der CEA-Spiegel abfiel, während er bei 6 der 8 Fälle mit deutlicher Verschlechterung anstieg, bei einem hochpathologisch blieb und bei einem abfiel. Die übrigen 19 Fälle mit geringen bzw. ohne klinische Veränderungen zeigten unterschiedliches Verhalten. CHU hält aufgrund dieser Be-

funde den CEA-Test für nicht geeignet, den Verlauf der Krankheit zu überwachen, auch deswegen, weil bei seinen Fällen der klinische Nachweis der Metastasierung bereits vor dem Anstieg der CEA-Werte möglich war. PICO et al. (143), die Serienbestimmungen bei 25 Kranken durchführten, berichten dagegen, daß der CEA-Spiegel bereits 1-8 Monate vor dem klinischen Nachweis der Metastasierung anstieg und daß im übrigen der klinische Verlauf eine gute Übereinstimmung mit dem Verhalten der CEA-Werte gezeigt habe, ohne jedoch genaue Zahlen zu nennen. Bei den eigenen Untersuchungen fand sich bei Verlaufsbeobachtungen von 69 Patientinnen ebenfalls eine relativ gute Übereinstimmung zwischen CEA-Spiegelverhalten und klinischem Verlauf (s. S. 41). Ein deutlicher Anstieg des CEA-Spiegels scheint für eine Progression zu sprechen, ein deutlicher Abfall für eine Remission, während man aus gleichbleibend hohen bzw. niedrigen Spiegeln kaum Rückschlüsse ziehen kann.

6. 2.2.3 Andere maligne Tumoren

Bei fast allen malignen Erkrankungen wurden bisher in der Literatur mehr oder minder ausgeprägte CEA-Spiegel-Erhöhungen beschrieben. Besonders hohe Prozentsätze pathologischer CEA-Spiegel wurden für das Pankreaskarzinom genannt (Sammelstatistik: 80%, eigene Untersuchungen: 83%), sodaß der CEA-Test gerade für diese schwer zu diagnostizierende Krankheit ein wertvolles Hilfsmittel sein könnte. Dem steht jedoch gegenüber, daß auch bei nicht malignen Erkrankungen, die differentialdiagnostisch abzugrenzen sind, häufig pathologische Werte beobachtet wurden, bei der Pankreatitis etwa durchschnittlich zu 43% (Sammelstatistik). NEUMAIER et al. (137) untersuchten 34 Fälle mit gesichertem Pankreaskarzinom und 10 Fälle mit Pankreatitis. Es fanden sich zwar nur beim Pankreaskarzinom stark er-

höhte Werte, statistisch waren beide Kollektive jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

Auch im Urin von Blasenkarzinompatienten wurden hohe Spiegel von CEA bzw. einer "CEA like substance" nachgewiesen. Bei den eigenen Untersuchungen fanden sich vor allem bei den bösartigeren Tumorformen (Histologie: Grad III oder IV) hohe CEA-Spiegel bis zu mehreren Hundert ng (s. S. 42), während bei den weniger malignen Tumorformen und vor allem bei den Urinproben von Normalpersonen die CEA-Spiegel überwiegend unter 10 ng/ml lagen. COOMBES et al. (26) fanden bei 58% von 106 Patienten mit Blasenkarzinomen erhöhte CEA-Spiegel im Urin, dagegen nur bei 16% von 133 Personen ohne urologische Erkrankung. Da aber bei 93% von 35 Patienten mit Blasenentzündungen die CEA-Konzentrationen erhöht waren, halten sie die Bedeutung der CEA-Bestimmung für die Diagnostik von Blasentumoren für gering. Etwas optimistischer äußerten sich FRASER et.al. (47), die ausschließlich sterilen, anläßlich einer Zystoskopie gewonnenen Urin verwandten. Nur bei 3 von 91 Patienten ohne urologische Erkrankung, jedoch bei 61 von 100 Patienten mit Blasenkarzinom und bei 23 von 35 Patienten mit Blasenentzündung waren die CEA-Spiegel erhöht. Wie bei den eigenen Untersuchungen zeigte sich auch bei ihnen eine gewisse Abhängigkeit zur Histologie: Bei Tumoren vom histologischen Grad I oder II waren 49% der CEA-Spiegel, vom Grad III oder IV aber 79% erhöht.

Die CEA-Bestimmung im Blut scheint einen etwas geringeren Anteil pathologischer Werte zu bringen. In der Studie von COOMBES et al. (26) hatten 40% der Kranken mit lokal begrenztem Blasentumor und 47% der Patienten mit Fernmetastasen erhöhte CEA-Plasma-Spiegel. Bei der eigenen Untersuchung fanden sich dagegen nur beim metastasierenden Blasenkarzinom nennenswert erhöhte CEA-Werte im Serum.

6. 2.3 Nicht maligne Erkrankungen

In der Literatur sind in einer Vielzahl von Untersuchungen für fast alle Krankheiten mehr oder minder ausgeprägte Erhöhungen des CEA-Spiegels beschrieben worden. (Sammelstatistik in Tab. 13). Zum Teil handelt es sich um Krankheiten wie Diabetes, Hypertonus und Herzinsuffizienz, die im höheren Alter sehr verbreitet sind, wo auch Karzinome am häufigsten sind. Dies beeinträchtigt den Wert des CEA-Tests als Diagnostikum ganz entscheidend. Es liegen jedoch bei den benignen Erkrankungen selten stark erhöhte Werte, etwa über 10 ng/ml vor, sodaß ein derartiger CEA-Spiegel doch ein Malignom wahrscheinlich macht.

Mit die meisten erhöhten CEA-Spiegel bei allen nicht malignen Erkrankungen werden bei der Leberzirrhose gefunden. Die Verteilung der CEA-Spiegel bei der eigenen Untersuchung (21,6% unter 3 ng/ml; 40,6% zwischen 3,1 und 5 ng/ml; 35,8% zwischen 5,1 und 15 ng/ml und 2% über 15 ng/ml) ist etwa vergleichbar mit den Werten der Sammelstatistik. Wie bei der eigenen Untersuchung wurde auch von MASSART et al. (126) keine Korrelation des CEA-Werts zu lebertypischen Parametern wie Bilirubin, Transaminasen, Gamma-GT u. a., noch zum Alpha-Fetoprotein gefunden. Sie beobachteten jedoch eine negative Korrelation zum Albuminspiegel. Daß bei der vorliegenden Untersuchung höhere Werte bei Virushepatitis (54% unter 3 ng/ml; 27% zwischen 3,1 und 5 ng/ml; 15% zwischen 5,1 und 15 ng/ml und 4% über 15 ng/ml) gefunden wurden, könnte mit darauf zurückzuführen sein, daß bei Verlaufsbestimmungen der CEA-Spiegel meist abnahm und für die obengenannte Verteilung immer der erste Wert berücksichtigt wurde.

Dasselbe gilt für die Colitis ulcerosa, wo die Verteilung der CEA-Werte der eigenen Untersuchung (44,4% unter 3 ng/ml; 7,1% zwischen 3,1 und 5 ng/ml; 28,5% zwischen 5,1 und 15,0 ng/ml und 21,5% über 15 ng/ml) deutlich über

POSITIVITÄTSRATEN DER CEA-SERUM/PLASMA-SPIEGEL BEI PATIENTEN MIT NICHT MALIGNEN ERKRANKUNGEN (SAMMELSTATISTIK)

Diagnose	Anzahl	Pos.-R.(%)	Referenz
Colitis ulcerosa	655	18%	5,10,28,48,55,68,108,110,113,131,133,134,136,140,155,158,162,176,185
M. Crohn	364	27%	5,10,28,48,68,108,110,125,136,155,158,176,185
Diverticulitis Diverticulose	409	23%	5,10,28,48,49,68,108,110,116,125,127,131,133
Polypen	348	16%	5,28,29,48,68,108,110,113,116,125,127,131,134
Hepatitis	341	17%	5,24,28,48,68,108,110,113,116,125,127,131,134
Leberzirrhose	300	61%	10,28,48,68,85,108,123,125,130,131,133
Pankreatitis	214	43%	10,30,48,68,85,123,130,133
Lungenemphysem	49	57%	68
Hypertonus	156	28%	68
Herzerkrankungen	289	39%	68

TABELLE 13

der der Sammelstatistik liegt. Berücksichtigt man jedoch statt der ersten die jeweils letzten Bestimmungen, so ergibt sich folgende Verteilung: 85,8% unter 3,0 ng/ml; 7,1% zwischen 3,1 und 5 ng/ml und 7,1% über 5 ng/ml. Auch RULE et al. (158) machten die Beobachtung, daß bei der Colitis ulcerosa die CEA-Werte im Lauf der Erkrankung abnehmen.

6. 2.4 Schwangere und Neugeborene

Da es sich beim CEA wie beim Alpha-Fetoprotein um ein karzinofetales Antigen handelt, ist es nicht überraschend, daß sich im Fruchtwasser hohe CEA-Spiegel bis über 200 ng/ml fanden. Die CEA-Konzentrationen im Serum von schwangeren Frauen waren dagegen kaum erhöht (60% unter 3 ng/ml; 90% unter 5,0 ng/ml und 100% unter 8,6 ng/ml), im Gegensatz zum AFP, wo Konzentrationen von mehreren Hundert ng/ml angegeben werden (101). Das dürfte zu einem Teil am geringeren Molekulargewicht liegen (CEA: ca. 180000; AFP: ca. 65000), obwohl das vergleichbar schwere IgG die Placentaschranke passieren kann, zum anderen an dem etwa 100 x geringerem Konzentrationsunterschied zwischen Fruchtwasser und mütterlichem Blut. Wegen der außerordentlich großen Streuung der CEA-Werte (s. Abb. 29) dürfte die CEA-Bestimmung im Fruchtwasser im Gegensatz zur AFP-Bestimmung für die pränatale Diagnostik keine Bedeutung erlangen.

Im Serum von Neugeborenen fanden sich bei der vorliegenden Untersuchung normale bis mäßig erhöhte CEA-Spiegel (36% unter 3 ng/ml; 99% unter 10 ng/ml). Diese Ergebnisse sind gut vergleichbar mit denen von TROUPEL et al. (181), bei denen 46% im Normbereich lagen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Gewinnung von CEA wurden 110 Dickdarmkarzinome nach der leicht modifizierten Methode von KRUPEY homogenisiert und mit Perchlorsäure extrahiert. Aus dem lyophilisierten Extrakt wurde mit einer Folge von Gelfiltration mit Sepharose 6B und Sephadex G200 und einer abschließenden Affinitätschromatographie mit CnBr-aktivierter Sepharose 4B CEA isoliert, das sich als immunologisch rein erwies. Durch Immunisierung von Kaninchen wurden hochtitrige Anti-CEA-Seren erhalten, die nach Absorption mit Extrakten aus normalen Geweben, mit Normalserum und mit AB-Erythrozyten monospezifisch waren. Dieses Anti-CEA-Serum wurde zur Affinitätschromatographie und zusammen mit gereinigtem, ^{125}I-markiertem CEA zum Aufbau eines Doppelantikörper-Radioimmunoassays mit einem Meßbereich zwischen 2 und 160 ng/ml verwandt, der gute Reproduzierbarkeit zeigte.

Bei einem Normalkollektiv (N=60) fanden sich nur CEA-Spiegel unter 3 ng/ml. Während die CEA-Werte bei 138 schwangeren Frauen (Mittelwert: 2,9 ng/ml) und bei 94 Neugeborenen (Mittelwert: 3,8 ng/ml) nur wenig höher lagen, zeigten sich in 235 Fruchtwasserproben CEA-Spiegel bis über 200 ng/ml.

CEA-Spiegelerhöhungen über 3 ng/ml fanden sich bei Leberzirrhose zu 78%, bei Hepatitis zu 46%, bei M. Crohn zu 45% und bei Colitis ulcerosa zu 56%. Während es sich bei diesen nicht malignen Erkrankungen fast ausschließlich um gering bis mäßig erhöhte Werte handelte, wurden bei Karzinomen teilweise stark erhöhte Spiegel bis zu mehreren Tausend ng/ml ermittelt. Die Positivitätsraten betrugen beim Dickdarmkarzinom (präoperativ, N=92) 57%, beim metastasierenden Mammakarzinom (N=246) ebenfalls 57% und beim Pankreaskarzinom (N=18) 83%. Beim Blasenkarzinom fanden sich CEA-Spiegelerhöhungen vorwiegend im Urin, während die Serumspiegel nur bei ausgedehnter Metastasierung nennens-

wert erhöht waren.

Bei Verlaufsbestimmungen von 16 Patienten mit Dickdarmkarzinom über einen Zeitraum von bis zu 3 Jahren stimmten der klinische Verlauf und das CEA-Spiegelverhalten gut miteinander überein. Weniger deutlich war diese Übereinstimmung bei Serienbestimmungen von Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom unter internistischer Therapie.

Aus diesen Ergebnissen geht übereinstimmend mit der Literatur hervor, daß der CEA-Test nicht als Screening-Methode zur Krebsfrüherkennung geeignet ist. In Einzelfällen kann ein deutlich erhöhter CEA-Spiegel dennoch ein wesentlicher Hinweis auf eine maligne Erkrankung sein. Die Hauptindikation für die CEA-Bestimmung liegt in der Verlaufskontrolle nach Operation eines Dickdarmkarzinoms, aber auch anderer maligner Tumoren. Die Wertigkeit der CEA-Bestimmung als Therapiekontrolle bei zytostatischer oder hormoneller Tumortherapie (vor allem beim Mammakarzinom), die klinisch noch interessanter wäre, läßt sich noch nicht endgültig beurteilen.

8 L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ABELEV, G.I., S.D.PEROVA, N.I.KHRAMKOVA, Z.A.POSTNIKOVA and I.S.IRLIN:
Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas.
Transpl. Bull. 1: 174 (1963)

2. ABEYOUNIS, C.J., and F.MILGROM:
Studies on carcinoembryonic antigen.
Int.Arch.All.Appl.Immunol. 43: 30 (1972)

3. AUER, T.O., L.SCHMID, B.HÖCHT, G.KAUFNER, R.LECLERQ:
Die klinische Wertigkeit der Plasma-CEA-Konzentration bei der postoperativen Verlaufskontrolle von Karzinomen des Verdauungstrakts.
aus LEHMANN, F.-G.: Tumorantigene in der Gastroenterologie. Gräfelfing 1976. S. 73

4. BALI,J.P., J.FOURNAJOUX, H.SEBAH, J.L.BALMES and R.MERIGNAN:
Comparative study of two direct radioimmunoassay methods for carcinoembryonic antigen.
Biol. et Gast.-Ent. 6:297 (1973)

5. BAND, P., H.HYDE, M.FELDSTEIN, T.McPHERSON and V.PATWARDHAN:
Carcinoembryonic antigen(CEA): A comparison of the FARR and Z-gel methods for CEA detection in benign and malignant diseases.
Europ. J.Cancer 9: 597 (1973)

6. BANJO,C., J.SHUSTER and P.GOLD:
Intermolecular heterogeneity of the carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 34: 2114 (1974)

7. BANWO,O., J.VERSEY, J.R.HOBBS:
New oncofetal antigen for human pancreas.
Lancet I: 643 (1974)

8. BOENISCH,T. and S.RAAM:
Rapid radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen (CEA) in ultrafiltered perchloric acid extracts: results of a clinical survey.
Clin. Chim. Acta 58: 195 (1975)

9. BOENISCH, T. and B.NORGAARD-PEDERSON:
Carcinoembryonic antigen (CEA) of human tissue extracts: partial characterization of two variants separated by affinity chromatography on concanavalin A.
Clin. Chim. Acta 60: 51(1975)

10. BOOTH, S.N., J.P.KING, J.C.LEONARD and P.W.DYKES:
Serum carcinoembryonic antigen in clinical disorders.
Gut 14: 794 (1973)

11. BREBOROWITZ, J., G.C.EASTY and A.M.NEVILLE:
In-vitro production of carcinoembryonic antigen by normal and neoplastic colon.
Lancet II: 1393 (1973)

12. BURTIN,P. BUFFE,D., S.v.KLEIST, Em.WOLFF et Et.WOLFF:
Mise en évidence de l'antigène carcinoembryonnaire spécifique des cancers digestifs dans des tumeurs humaines entretenues en culture organotypique.
Int.J.Cancer 5: 88 (1970)

13. BURTIN,P., G.CHAVANEL, S.v.KLEIST:
Demonstration in normal human plasma of an antigen that cross-reacts with the carcinoembryonic antigen of digestive tract tumors.
J.Natl.Cancer Inst. 49:1727 (1972)

14. BURTIN,P., M.C.SABINE and G.CHAVANEL:
Presence of carcinoembryonic antigen in childrens colonic mucosa.
Int.J.Cancer 10: 72 (1972)

15. BURTIN,P., S.v.KLEIST and G.CHAVANEL:
Further studies on carcinoembryonic antigens.
J.Natl.Cancer Inst.Monogr. 35:421 (1973)

16. BURTIN,P., S.v.KLEIST, M.C.SABINE and M.KING:
Immunohistological localization of carcinoembryonic antigen and nonspecific crossreacting antigen in gastrointestinal normal and tumoral tissues.
Cancer Res. 33: 3299 (1973)

17. CHU,T.M., G.REYNOSO:
Evaluation of a new radioimmunoassay method for carcinoembryonic antigen in plasma, with use of zirconyl phosphate gel.
Clin.Chem. 18: 918 (1972)

18. CHU,T.M., TAKUMA NEMOTO:
Evaluation of carcinoembryonic antigen in human mammary carcinoma.
J.Natl.Cancer Inst. 51: 1119 (1973)

19. CHU,T.M., E.D.HOLYOKE and G.P.MURPHY:
The reaction between carcinoembryonic antigen and concanavalin A.
Cancer Res. 34: 212 (1974)

20. COLIGAN,J.E., M.L.EGAN and C.W.TODD:
Detection of carcinoembryonic antigen by radioimmune assay.
Natl.Cancer Inst.Monogr. 35:427 (1972)

21. COLIGAN,J.E., J.T.LAUTENSCHLÄGER, M.L.EGAN, C.W.TODD:
Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen.
Immunochem. 10: 377 (1972)

22. COLIGAN,J.E., P.A.HENKART, C.W.TODD and W.D.TERRY:
Heterogeneity of the carcinoembryonic antigen.
Immunochem. 10:591 (1973)

23. COLLATZ,E., S.v.KLEIST, P.BURTIN:
Further investigations of circulating antibodies in colon cancer patients: on the autoantigenicity of carcinoembryonic antigen.
Int.J.Cancer 8: 298 (1971)

24. COLLER,J.A., R.W.CRICHLOW and L.K.YIN:
Radioimmunoelectrophoretic binding assay for the detection of carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 33:1684 (1973)

25. CONCANNON,J.P., M.H.DALBOW, G.A.LIEBLER, K.E.BLAKE, C.S.WEIL and J.W.COOPER:
The carcinoembryonic antigen assay in bronchogenic carcinoma.
Cancer 34: 184 (1974)

26. COOMBES,G.B., R.R.HALL, D.J.LAURENCE and A.M.NEVILLE:
Urinary carcinoembryonic antigen (CEA)-like molecules and urothelial malignancy: a clinical appraisal.
Brit.J.Cancer 31: 135 (1975)

27. COOPER,A.G., M.C.BROWN, M.E.KIRCH and A.H.RULE:
Relationship of carcinoembryonic antigen to blood substances A and i: Evidence that the antigenic sites are on different molecules.
J.Immunol. 113: 1246 (1974)

28. CONSTANZA,M.E., S.DAS, L.NATHANSON, A.RULE and R.S.SCHARTZ:
Carcinoembryonic antigen: Report of a screening study.
Cancer 33: 583 (1974)

29. DARANI,M., A.DUBIN, F.VILLA, P.SZANTO and F.STEIGMANN:
Carcinoembryonic antigen.
1974 Digest.Dis.week S.F. May 1974 of the Am.Ass.for the study of the liver dis.

30. DELWICHE,R., N.ZAMCHEK and N.MARCON:
Carcinoembryonic antigen in pancreatitis.
Cancer 31: 328 (1973)

31. DENK,H., G.TAPPEINER, R.ECKERSDORFER and J.H.HOLZNER:
Carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal and extragastrointestinal tumors and its relationship to tumor-cell differentiation.
Int.J.Cancer 10: 262 (1972)

32. DHAR,P., T.L.MOORE, H.Z.KUPCHIK and N.ZAMCHEK:
Serum carcinoembryonic antigen (CEA) in colonic cancer: preliminary findings in resected patients.
Gastroent. 60: 655 (1971)

33. DHAR,P., T.MOORE, H.Z.KUPCHIK, N.ZAMCHEK:
Carcinoembryonic antigen (CEA) in colonic cancer.
JAMA 221: 31 (1972)

34. DYCE,B.J. and B.J.HAVERBACK:
Free and bound carcinoembryonic antigen in neoplasms and in normal adult and fetal tissue.
Immunochem. 11: 433 (1974)

35. EDGIGTON,T.S., R.W.ASTARITA, E.F.PLOW:
Association of CEA-S with neoplasia of the GI tract.
New Engl.J.Med. 293: 103 (1975)

36. Editorial
CEA-S - a more specific CEA?
New Engl.J.Med. 293: 145 (1975)

37. EDYNAK,E.M., L.J.OLD, M.VRANA and M.P.LARDIS:
A fetal antigen associated with human neoplasia.
New Engl.J.Med. 286: 1178 (1972)

38. EGAN,M.L., J.E.COLIGAN, J.T.LAUTENSCHLÄGER:
The triple isotope double antibody assays: application to the carcinoembryonic antigen.
In "Fetal and embryonic antigens in cancer" Ed. N.G.ANDERSON, J.H.COGGIN, E.COLE, J.W.HOLLEMANN. 2:267 (1972)

39. EGAN,M.L. and C.W.TODD:
Carcinoembryonic antigen: synthesis by a continuous line of adenocarcinoma cells.
J.Natl.Cancer Inst. 49: 887 (1972)

40. EGAN,M.L., J.T.LAUTENSCHLEGER, J.E.COLIGAN and C.W.TODD:
Radioimmune assay of carcinoembryonic antigen.
Immunochemistry 9: 289 (1972)

41. ELIAS,E.G., E.D.HOLYOKE, T.M.CHU:
Carcinoembryonic antigen (CEA) in feces and plasma of normal subjects and patients with colorectal carcinoma.
Dis.Col.Rect. 17: 38 (1974)

42. EVELEIGH,J.W.
Heterogeneity of carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 34: 2122 (1974)

43. FARR,R.S.
A quantitative immumochemical measure of the primary interaction between I-BSA and antibody.
J.infect.Dis. 103: 259 (1958)

44. FISHMAN,W.H., N.R.INGLIS, L.L.STOLBACH, M.J.KRANT:
A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin.
Cancer Res. 28: 150 (1968)

45. FLEISHER,M., H.F.OETTGEN, E.BESENFELDER and M.K.SCHWARTZ:
Selected method: measurement of carcinoembryonic antigen.
Clin.Chem. 19: 1214 (1973)

46. FRANCHIMONT,P., M.L.DEBRUCHE, P.F.ZANGERLEE et J.PROYARD:
Dosage radio-immunologique de l'antigène carcinoembryonnaire
Ann.Immunol. (Inst.Past.) 124C: 619 (1973)

47. FRASER,R.A., M.J.RAVRY, J.W.SEGURA, V.L.W.GO:
Clinical evaluation of urinary and serum carcinoembryonic antigen in bladder cancer.
J.Urol. 114: 226 (1975)

48. FREEDMAN,S.O.:
Carcinoembryonic antigen: current clinical applications.
J.Allergie Clin.Immunol. 50: 348 (1972)

49. GO,V.L.W., SCHUTT,A.J., C.G.MOERTEL, W.H.J.SUMMERSKILL and H.R.BUTT:
Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen (CEA), a modified method and a clinical evaluation.
Gastroenterol. 62: 754 (1972)

50. GOLD,P. and S.O.FREEDMAN:
Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques.
J.exp.Med. 121: 439 (1965)

51. GOLD,P. and S.O.FREEDMAN:
Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
J.exp.Med. 122: 467 (1965)

52. GOLD,P., D.M.P.THOMSON, J.KRUPEY and S.O.FREEDMAN:
Radioimmunoassay for circulating carcinoembryonic antigen.
J.Allergy 45: 112 (1970)

53. GOLD,J.M. and P.GOLD:
The blood group A-like site on the carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 33: 2821 (1973)

54. GOLD,J.M.,C.BANJO, S.O.FREEDMAN and P.GOLD:
Immunochemical studies of the intramolecular heterogeneity of the carcinoembryonic antigen (CEA) of the human digestiv system.
J.Immunol. 111: 1872 (1973)

55. GOLD,P., T.WILSON, R.ROMERO, J.SHUSTER, S.O.FREEDMAN:
Further evaluation of the radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen of the human digestive system as an adjunct in cancer diagnosis.
Dis.Colon Rect. 16: 358 (1973)

56. GOLDENBERG,D.M., R.A.PAVIA, H.J.HANSEN and J.P.VANDEVOORDE:
Synthesis of carcinoembryonic antigen in vitro.
Nature New Biol. 239: 189 (1972)

57. GOLESKI,C., H.D.JANOWITZ, A.H.RULE:
CEA-like antigen: presence in tumor, normal colon and meconium extracts.
Fed.Proc. 31: 639 (1972)

58. GRABAR,P. et C.A.WILLIAMS:
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines, application au sérum sanguin.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 10: 193 (1953)

59. HÄKKINEN,I.P.T.:
An immunochemical method for detecting carcinomatous secretion from human gastric juice.
Scand.J.Gastroent. 1: 28 (1966)

60. HÄKKINEN,I. and VIIKARI,S.:
Occurence of fetal sulphoglycoprotein antigen in the gastric juice of patients with gastric diseases.
Ann.Surg. 169: 277 (1969)

61. HÄKKINEN,I.P.T.:
Immunological relationship of the carcinoembryonic antigen and the fetal sulphoglycoprotein antigen.
Immunochem. 9: 1115 (1972)

62. HALL,R.R., D.J.R.LAURENCE, D.DARCY, U.STEVENS, R.JAMES, S.ROBERTS, A.M.NEVILLE:
Carcinoembryonic antigen in the urine of patients with urothelial carcinoma.
Brit.Med.J. 3: 609 (1972)

63. HAMADA,S., N.ISHIKAWA, T.IMURA, K.TORIZUKA, Y.MATSUMOTO, K.HONJO, T.MAYUMI:
Detection of circulating carcinoembryonic antigen (CEA) by counterimmunoelectrophoresis.
Clin.Chim.Acta 66: 365 (1976)

64. HANSEN,H.J., K.P.LANCE, J.KRUPEY:
Demonstration of an ion sensitive antigenic site on carcinoembryonic antigen using zirconyl phosphate gel.
Clin.Res. 19: 143 (1971)

65. HANSEN,H.J., H.J.HAGER, H.COHEN, J.KRUPEY:
Induction of an antiserum monospecific for carcinoembryonic antigen.
Clin.Res. 19: 153 (1971)

66. HANSEN,H.J. and P.LO GERFO:
Demonstration of a tumor-associated antigenic site in carcinoembryonic antigen preparations.
Embryonic and fetal antigens in cancer 1: 389 (1971)
Ed.N.G.ANDERSON,J.H.COGGIN (USAEC)

67. HANSEN,H.:
Carcinoembryonic antigens - general discussion.
Embryonic and fetal antigens in cancer 2: 273 (1972)

68. HANSEN,H.J., J.J.SNYDER, E.MILLER, J.V.VANDEVOORDE, O.N.MILLER, L.R.HINDS and J.J.BURNS:
Carcinoembryonic antigen (CEA) assay. A laboratory adjunct in the diagnosis and management of cancer.
Human Pathol. 5: 139 (1974)

69. HAVERBACK,B.J., B.J.DYCE:
Chemical characteristics of CEA and its presence in bronchogenic carcinoma, rhabdomyosarkoma and regional enteritis tissue.
Embryonic and fetal antigens in cancer 2: 241 (1972)

70. HAVERBACK,B.J. and B.J.DYCE:
Carbohydrate and protein analysis of carcinoembryonic antigen.
1974 Dig.Dis. week S.F. May 1974, Am.Ass. for the study of the liver.

71. HELMAN,E.Z., P.TING:
Carcinoembryonic antigen (CEA) test using dual labeled 125-I and 131-I for radioimmunoassay by LS counters.
CB-9 Clin.Briefs appl.Res.Scient.Instr.Div., Fullerton, Cal. Fa. BECKMAN INSTRUMENTS

72. HELMAN,E.Z, P.TING:
Carcinoembryonic antigen (CEA) test using dual labeled 125-I and 131-I for radioimmunoassay by the Beckman BIOGAMMA.
CB-14 Clin,Briefs appl.Res.Scient.Instr.Div., Fullerton, Cal. Fa. BECKMAN INSTRUMENTS

73. HERRERA,M., T.MING CHU, E.D.HOLYOKE:
Carcinoembryonic antigen (CEA) as a prognostic and monitoring test in clinically complete resection at colorectal carcinoma.
Ann.Surg. 183: 5 (1976)

74. HERRERA,M.A., T.MING CHU, E.D.HOLYOKE, A.MITTELMAN:
CEA monitoring at palliative treatment for colorectal carcinoma.
Ann.Surg. 185: 23 (1977)

75. HETRICK,D.L. and K.D.MILLER:
Antisera to carcinoembryonic antigen: Removal of persistent impurities.
Immunol.Comm. 3: 489 (1974)

76. HIJMANS,W., H.R.SCHUTT and F.KLEIN:
An immunofluorescence procedure for the detection of intracellular immunoglobulins.
Clin.Exp.Immunol. 4: 457 (1969)

77. HIRSCH-MARIE,H., G.CHAVANEL and P.BURTIN:
Carcinoembryonic (CEA) and CEA-like antigens in faeces.
Ann.Immunol. (Inst.Past.) 124C: 609 (1973)

78. HIRSZFELD,L., W.HALBER, J.LASKOWSKI:
Untersuchungen über die serologischen Eigenschaften der Gewebe II: Über serologische Eigenschaften der Neubildungen.
Z.Immun.Forsch.exp.Ther. 64: 81 (1929)

79. HIRSZFELD,L., W.HALBER, J.ROSENBLAT:
Untersuchungen über Verwandtschaftsreaktionen zwischen Embryonal- und Krebsgewebe II. Vorläufige Mitteilung: Menschenembryo und Menschenkrebs.
Z.Immunitätsforsch.Allerg.Klin.Immunol. 75: 209 (1932)

80. HOLYOKE,D., G.REYNOSO and T.M.CHU:
Carcinoembryonic antigen(CEA) in patients with carcinoma of the digestive tract.
Ann.Surg. 176: 559 (1972)

81. HOLYOKE,E.D., T.MING CHU and G.P.MURPHY:
CEA as a monitor of gastrointestinal malignancy.
Cancer 35: 830 (1975)

82. HUNTER,W.M.:
Radioimmunoassay.
aus WEIR,D.M.: Handbook of experimental immunology, 2 nd Ed. Kap. 17. Publ. Blackwell Scientific Publ. Oxford/London/Edinburgh/Melbourne 1973

83. ISOTOPENDIENST WEST-CEA-Testbeschreibung
Dosage de l'antigène carcinoembryonnaire.(1975)

84. JAEGER,Ph., J.PETTAVEL, B.B.WUILLERET, M.M.BERTHOLET, J.P.MACH:
Utilité et limites du dosage de l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) dans la surveillance postopératoire de malades atteints de carcinomes du colon et du rectum.
Schweiz.med.Wschr. 105: 1533 (1975)

85. KHOO,S.K. and I.R.MACKAY:
Carcinoembryonic antigen in serum in diseases of the liver and pancreas.
J.Clin.Path. 26: 470 (1973)

86. KHOO,S.K., N.L.WARNER, J.T.LIE and I.R.MACKAY:
Carcinoembryonic antigenic activity of tissue extracts: A quantitative study of malignant and benign neoplasms, cirrhotic liver, normal adult and fetal organs.
Int.J.Cancer 11:681 (1973)

87. KLEINMAN,M.S., HARWELL,L. and TURNER,M.D.:
Studies of colonic carcinoma antigens.
GUT 12: 1 (1971)

88. KLEINMAN,M.S. and M.D.TURNER:
Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen in serum of normal subjects and patients with colonic carcinoma.
GUT 13: 390 (1972)

89. KLEIST,S.v., P.BURTIN:
Isolation of a fetal antigen from human colonic tumors.
Cancer Res. 29: 1961 (1969)

90. KLEIST,S.v. et P.BURTIN:
Localisation cellulaire d'un antigène embryonnaire de tumeurs coliques humaines.
Int.J.Cancer 4: 874 (1969)

91. KLEIST,S.v.:
Etude d'un antigène spécifique de tumeurs coliques humaines d'origine embryonnaire.
Biol.Med. (Paris) 60: 237 (1971)

92. KLEIST,S.v., G.CHAVANEL and P.BURTIN:
Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen.
Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.) 69: 2492 (1972)

93. KLEIST,S.v.:
Substances immunologically related to CEA.
Ann.Immunol. (Inst.Past.) 124C: 589 (1973)

94. KLEIST,S.v., M.KING and P.BURTIN:
Characterisation of a normal tissular antigen extracted from human colonic tumors.
Immunochem. 11: 249 (1974)

95. KLEIST,S.v., S.TROUPEL, M.KING, P.BURTIN:
Etude comparative du taux sérique duNCA et du CEA. Evaluation de l'intérêt clinique.
Bull.du cancer 4: 627 (1976)

96. KNEDEL,M. und A.FATEH-MOGHADAM:
Die Gradientenelutionschromatographie.
"G-I-T" (Darmstadt) Okt. 1965, S. 675

97. KRUPEY,J.,P.GOLD, S.O.FREEDMAN:
Purification and characterisation of carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
Nature 215:67 (1967)

98. KRUPEY,J., P.GOLD and S.O.FREEDMAN:
Physicochemical studies of the carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
J.Exp.Med. 128: 387 (1968)

99. KRUPEY,J., T.WILSON, S.O.FREEDMAN and P.GOLD:
The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue.
Immunochem. 9: 617 (1972)

100. LAMERZ,R. und A.FATEH-MOGHADAM:
Radioimmunologische Bestimmungen von Immunglobulin E.
Klin.Wschr. 52: 18 (1974)

101. LAMERZ,R. und A.FATEH-MOGHADAM:
Carcinofetale Antigene. I. Alpha-Fetoprotein.
Klin.Wschr. 53: 147 (1975)

102. LAMERZ,R. und A.FATEH-MOGHADAM:
Carcinofetale Antigene. II. Carcinoembryonales Antigen (CEA).
Klin.Wschr. 53: 193 (1975)

103. LAMERZ,R. und A.FATEH-MOGHADAM:
Carcinofetale Antigene. III. Andere carcinofetale Antigene.
Klin.Wschr. 53: 403 (1975)

104. LAMERZ,R. und H.RUIDER:
Zur Bestimmung des carcinoembryonalen Antigens: Erfahrungen mit einem neuen Radioimmunoassay.
Z.Anal.Chem. 279: 105 (1976)

105. LAMERZ,R. und H.RUIDER:
CEA-Bestimmungen im Serum von Patienten mit Dickdarmkarzinomen.
In F.-G. LEHMANN: Tumorantigene in der Gastroenterologie. Karl Demeter Verlag. Gräfelfing 1976. S. 79

106. LAMERZ,R.,H.RUIDER:
Significance of CEA determinations in patients with cancer of the colon-rectum and the mammary gland in comparison to physiological states in connection with pregnancy.
Bull. du cancer 63: 587 (1976)

107. LANGE,R.D., A.I.CHERNOFF, T.A.JORDAN and I.COLLMANN:
Experience with a haemagglutination inhibition test for carcinoembryonic antigen: preliminary report.
Embryonic and fetal antigens in cancer 1: 379 (1971)

108. LAURENCE,D.J.R.,U.STEVENS, R.BETTELHEIM, D.DARCY, C.LEESE, C.TURBERVILLE, P.ALEXANDER, E.W.JOHNS and A.M.NEVILLE:
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of gastrointestinal, mammary and bronchial carcinoma.
Brit.Med.J. 3: 605 (1972)

109. LAURENCE,D.J.R., A.M.NEVILLE:
Clinical aspects of the CEA test.
Bull.du cancer 63: 473 (1976)

110. LEBEL,J.S., S.D.DEODHAR and C.H.BROWN:
Newer concepts of cancer of the colon and rectum: clinical evaluation of a radioimmunoassay for CEA.
Dis.Colon.Rect. 15: 111 (1972)

111. LEHMANN,F.-G., H.LORENZ und C.GROPP:
Karzino-embryonale Proteine im sekretinstimulierten Galle-Pankreas-Sekret.
In F.-G.LEHMANN: Tumorantigene in der Gastroenterologie. Karl Demeter Verlag. Gräfelfing 1976. S. 97

112. LIVINGSTONE,A.S., L.G.HAMPSON, J.SHUSTER, P.GOLD, E.J.HINCHEY:
Carcinoembryonic antigen in the diagnosis and management of colorectal carcinoma: current status.
Arch.Surg. 109: 259 (1974)

113. LO GERFO,P., J.KRUPEY and H.J.HANSEN:
Demonstration of an antigen common to several varieties of neoplasia.
New Engl.J.Med. 285: 138 (1971)

114. LO GERFO,P.L., F.P.HERTER and S.J.BENNETT:
Absence of circulating antibodies to carcinoembryonic antigen in patients with gastrointestinal malignances.
Int.J.Cancer 9: 344 (1972)

115. LO GERFO,P., F.P.HERTER, J.BRAUN and H.J.HANSEN:
Tumor associated antigen with pulmonary neoplasms.
Ann.Surg. 175: 495 (1972)

116. LO GERFO,P., F.LO GERFO, H.G.BARKER, H.J.HANSEN:
Tumor-associated antigen in patients with carcinoma of the colon.
Am.J.of Surgery 123: 127 (1972)

117. LO GERFO,P., F.P.HERTER, V.L.VOLSI and S.BENNETT:
Studies on tumor-associated antigens: TAA.
J.Surg.Res. 15:290 (1973)

118. LUZZI,M. et R.DEPIEDS:
Méthodes d'obtention d'immunsérums anti-antigène carcinoembryonnaire à partir de tumeur colique.
Ann.Inst.Past. 122: 341 (1972)

119. MACH,J.P. and PUSZTASZERI,G.:
Carcinoembryonic antigen (CEA): demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein.
Immunochem. 9: 1031 (1972)

120. MACH,J.P., G.PUSZTASZERI, M.DYSLI, F.KAPP, B.BIERENS DE HAAN, R.M.LOOSLI, P.GROB et H.ISLIKER:
Dosage radioimmunologique de l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) dans le plasma de malades atteints de carcinomes.
Schweiz.Med.Wschr. 103: 365 (1973)

121. MACH,J.P. and A.HOLBURN:
Immunochemistry and biochemistry of CEA.
Ann.Immunol. (Inst.Past.) 124C: 579 (1973)

122. MACH,J.P., P.JAEGER, M.M.BERTHOLET, C.H.RUEGSEGGER, R.M.LOOSLI, J.PETTAVEL:
Detection of recurrence of large-bowel carcinoma by radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen (CEA).
Lancet II: 535 (1974)

123. MAC SWEEN, J.M., N.L.WARNER, A.D.BANKHURST and I.R.MACKAY:
Carcinoembryonic antigen in whole serum.
Br.J.Cancer 26: 356 (1972)

124. MARTIN,F., M.S.MARTIN:
Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen in extracts of human colon and stomach.
Int.J.Cancer 9: 641 (1972)

125. MARTIN,F., C.KLEPPING et J.GUERRIN:
Dosage radioimmunologique de l'antigène carcino-embryonnaire circulant. Extraction immunoperchlorique du sérum.
Arch.franc.Malad.App.digest. 61: 725 (1972)

126. MASSART,J.P., B.MERIADEC, C.KLEPPING, F.MARTIN:
Antigène carcinoembryonnaire, alcool et cirrhose.
Bull.du cancer 63: 639 (1976)

127. McCARTNEY,W.H. and P.B.HOFFER:
The value of carcinoembryonic antigen (CEA) as an adjunct to the radiological colon examination in the diagnosis of malignancy.
Radiology 110: 325 (1974)

128. McPHERSON,T.A., P.R.BAND, M.GRACE, H.A.HYDE and V.C. PATWARDHAN:
Carcinoembryonic antigen (CEA): comparison of the FARR and solid-phase methods for detection of CEA.
Int.J.Cancer 12: 42 (1973)

129. MEEKER,W.R., R.KASHMIRI, L.HUNTER, W.CLAPP, W.C.GRIFFEN:
Clinical evaluation of carcinoembryonic antigen test.
Arch.Surg. 107: 266 (1973)

130. MERIADEC,B.,F.MARTIN, J.GUERRIN, R.HENRY et C.KLEPPING:
Description d'une méthode de dosage de l'antigène carcinoembryonnaire. Premiers résultats cliniques.
Bull.du cancer 60: 403 (1973)

131. MILLER,A.B.:
A joint national cancer institute of Canada/American cancer society investigation. A collaborative study of a test for carcinoembryonic antigen (CEA) in the sera of patients with carcinoma of the colon and rectum.
Canad.Med.Ass.J. 107: 25 (1972)

132. MILLER,A.B.:
The Joint national cancer institute of Canada/American cancer society study of a test for carcinoembryonic antigen (CEA).
Cancer 34: 932 (1974)

133. MOORE,T., P.DHAR, N.ZAMCHEK, H.Z.KUPCHIK:
Carcinoembryonic antigen (CEA) in diagnosis of digestive tract cancer.
Embryonic and fetal antigens in cancer 1: 393 (1971)

134. MOORE,T.L., H.Z.KUPCHIK, N.MARCON and N.ZAMCHEK:
Carcinoembryonic antigen assay in cancer of the colon and pancreas and other digestive tract disorders.
Amer.J.Dig.Dis. 16:1 (1971)

135. MOORE,T., P.DHAR, N.ZAMCHEK, A.KEELEY, L.GOTTLIEB, H.Z.KUPCHIK:
Carcinoembryonic antigen in liver disease. I. Clinical and morphological studies.
Gastroent. 63: 88 (1972)

136. MOORE,T.L., P.A.KANTROWITZ and N.ZAMCHEK:
Carcinoembryonic antigen (CEA) in inflammatory bowel disease.
JAMA 222:944 (1972)

137. NEUMAIER,D., B.GLÜCK, A.FATEH-MOGHADAM, M.KNEDEL:
Klinische Bedeutung der CEA-Bestimmung in der Diagnostik des Pankreaskarzinoms.
in F.-G.LEHMANN: Tumorantigene in der Gastroenterologie.
Karl Demeter Verlag. Gräfelfing 1976. S. 95

138. NEVILLE,A.M., R.NERY, R.R.HALL, C.TURBERVILLE and D.J.R.LAURENCE:
Aspects of the structure and clinical role of the carcinoembryonic antigen (CEA) and related macromolecules with particular reference to urothelial carcinoma.
Br.J.Cancer 28: Suppl.I: 198 (1973)

139. NEWMAN,E.S., S.E.PETRAS, E.GEORGIADIS and H.J.HANSEN:
Interrelationship of carcinoembryonic antigen and colon carcinoma antigen-III.
Cancer Res. 34: 2125 (1974)

140. NUGENT,F.W. and E.R.HANSEN:
Radio-immunoassay of carcinoembryonic antigen as a diagnostic test for cancer of the colon: a preliminary report.
Lahey Clinic Found.Bull. 20: 85 (1971)

141. ONA,F.V., N.ZAMCHEK, N.P.DHAR, T.MOORE and H.Z.KUPCHIK:
Carcinoembryonic antigen (CEA) in the diagnosis of pancreatic cancer.
Cancer 31: 324 (1973)

142. OUCHTERLONY,Ö.:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Progress in Allergy 5: 1 (1958)

143. PICO,J.L., R.HENRY,B.MERIADEC, J.L.SALARD:
Intérêt du dosage de l'antigène carcinoembryonnaire dans le bilan et la surveillance des cancers du sein.
Bull.du cancer 63: 595 (1976)

144. PLOW,E.F. and T.S.EDGINGTON:
Isolation and characterization of a homogenous isomeric species of carcinoembryonic antigen: CEA-S.
Int.J.Cancer 15: 748 (1975)

145. POTTER,R.V.:
Introductory remarks on nucleic acid metabolism.
Texas Rep.Biol.Med. 15: 127 (1957)

146. Procedure Manual for CEA-Roche
Carcinoembryonic Antigen Assay - an in vitro test to aid in the management and diagnosis of cancer.
ROCHE Diagnostics, Division of HOFFMANN-LA ROCHE Inc.
Nutley, New Jersey 07110

147. PUSZTASZERI,G., J.P.MACH et M.DYSLI:
Démonstration de déterminants antigéniques communs entre l'antigène carcinoembryonnaire digestive et une glycoprotéine extraite des tissues normaux.
Schweiz.med.Wschr. 102: 1157 (1972)

148. RAVRY,M., C.G.MOERTEL, A.J.SCHUTT and V.L.GO:
Usefullness of serial serum carcinoembryonic antigen (CEA) determinations during anticancer therapy or long-term follow-up of gastrointestinal carcinoma.
Cancer 34: 1230 (1974)

149. RAVRY,M.J., K.R.McINTIRE, A.J.SCHUTT, T.A.WALDMANN, C.G.MOERTEL and V.L.GO:
Carcinoembryonic antigen (CEA), alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin-beta subunit (hCG-beta) in gastrointestinal cancer.
1974 Dig.Dis.Week, May 1974, Am.Ass.for the study of the liver.

150. RAVRY,M.K., R.McINTIRE, C.G.MOERTEL, T.A.WALDMANN, A.J.SCHUTT, V.L.GO:
Carcinoembryonic antigen and alpha-fetoprotein in the diagnosis of gastric and colonic cancer. A comparative clinical evaluation.
J.Natl.Cancer inst. 52: 1019 (1974)

151. REYNOSO,G., T.M.CHU, D.HOLYOKE, E.COHEN, T.NEMOTO, J.J.WANG, J.CHUANG, P.GUINAN and G.P.MURPHY:
Carcinoembryonic antigen in patients with different cancers.
J.Am.Med.Ass. 220: 361 (1972)

152. REYNOSO,G., T.M.CHU,P.GUINAN and G.P.MURPHY:
Carcinoembryonic antigen in patients with tumors of the urogenital tract.
Cancer 30: 1 (1972)

153. ROGERS,G.T., F.SEARLE and K.D.BAGSHAWE:
Heterogeneity of carcinoembryonic antigen and its fractionation by con A affinity chromatography.
Nature 251: 519 (1974)

154. ROSAI,J., T.W.TILLACK and V.T.MARCHESI:
Membrane antigens from human colonic carcinoma and non-tumoral colonic mucosa: results obtained with a new isolation method.
Int.J.Cancer 10: 357 (1972)

155. RULE,A.H., E.STRAUS, J.VANDEVOORDE and H.D.JANOWITZ:
Tumor-associated (CEA-reacting) antigens in patients with inflammatory bowel disease.
New.Engl.J.Med. 287: 24 (1972)

156. RULE,A.H. and C.GOLESKI-REILLY:
Carcinoembryonic antigen (CEA): Separation of CEA-reacting molecules from tumor, fetal gut, meconium and normal colon.
Immunol.Comm. 2: 213 (1973)

157. RULE,A.H. and C.GOLESKI-REILLY:
Carcinoembryonic antigen (CEA)"fingerprints".
Brit.J.Cancer 28:464 (1973)

158. RULE,A.H., C.GOLESKI-REILLY, D.B.SACHAR, J.VANDEVOORDE and H.D.JANOWITZ:
Circulating carcinoembryonic antigen (CEA): Relationship to clinical status of patients with inflammatory bowel disease.
GUT 14: 880 (1973)

159. SARAVIS,C.A., N.ZAMCHEK, H.Z.KUPCHIK, R.P.McCABE and D.MUNJAL:
Solid-phase radioimmunoelectrophoresis: an assay for carcinoembryonic antigen.
J.Natl.Cancer Inst. 53: 921 (1974)

160. SCHEIDEGGER,J.J.:
Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.
Int.Arch.Allergy 7: 103 (1955)

161. SCHMALHORST,U.:
Bedeutung der Serum-Alpha-Fetoproteinbestimmung in der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung des primären Leberkarzinoms und Lebererkrankungen (Erfahrungen mit einem eigenen Radioimmunoassay).
Inauguraldissertation, München 1976

162. SEARLE,F., A.C.LOVESEY, B.A.ROBERTS, G.T.ROGERS, K.D.BAGSHAWE:
Radioimmunoassay methods for carcinoembryonic antigen.
J.Immunol.Meth. 4: 113 (1974)

163. SHARMA,M.P., J.GREGG, R.P.McCABE, M.S.LOEWENSTEIN, B.B.LURIE, N.ZAMCHEK:
Carcinoembryonic antigen (CEA)-like activity in pancreatic juice of patients with pancreatic carcinoma and pancreatitis.
Gastroenterology 66:776 (1974)

164. SHUSTER,J., A.LIVINGSTONE, C.BANJO, H.K.B.SILVER, S.O.FREEDMAN and P.GOLD:
Immunologic diagnosis of human cancers.
Am.J.Clin.Pathol. 62: 243 (1974)

165. SIMMONS,D.A. and P.PERLMANN:
Carcinoembryonic antigen and blood group substances.
Cancer Res. 33: 313 (1973)

166. SKARIN,A.T., R.DELWICHE, N.ZAMCHEK, J.J.LOKICH and E.FREI:
Carcinoembryonic antigen: Clinical correlation with chemotherapy for metastatic gastrointestinal cancer.
Cancer 33: 1239 (1974)

167. SMITH,H.J., P.H.FIGARD, P.J.O'NEILL and M.GOKCEN:
Carcinoembryonic antigen (CEA): Radioimmunoassay using highly purified CEA and 125-I CEA.
Res.Comm.Chem.Path.Pharm. 5: 573 (1973)

168. SMITH,H.J., P.H.FIGARD and M.GOKCEN:
Simplified direct radioimmunoassay method for measuring carcinoembryonic antigen.
Res.Comm.Chem.Path.Pharm. 11: 107 (1975)

169. SOROKIN,J.J., P.H.SUGARBAKER, N.ZAMCHEK, M.PISICK, H.Z.KUPCHIK, F.D.MOORE:
Serial carcinoembryonic antigen assays.
J.Amer.Med.Ass. 228: 49 (1974)

170. STAAB,H.-J., F.A.ANDERER, E.STUMPF, R.FISCHER:
Computer-unterstützte postoperative CEA-Verlaufskontrollen: Korrelation der Rezidivprognosen mit den Befunden der Second-look-Operation.
In F.-G.LEHMANN: Tumorantigene in der Gastroenterologie. Karl Demeter Verlag. Gräfelfing 1976. S.85

171. STEWARD,A.M., D.NIXON, N.ZAMCHEK and A.AISENBERG:
Carcinoembryonic antigen in breast cancer patients: serum levels and disease progress.
Cancer 33: 1246 (1974)

172. SUGARBAKER,P.H., W.D.BLOOMER, E.D.CARBETT, J.T.CHAFFEY: Carcinoembryonic antigen (CEA) monitoring of radiation therapie for colorectal cancer.

173. TATARINOV,Y.S.: Detection of embryospecific alpha-globulin in the blood sera of patients with primary liver cancer. Vop.Med.Khim. 10: 90 (1964)

174. TERRY,W.D., P.A.HENKART, J.E.COLIGAN and C.W.TODD: Structural studies of the major glycoprotein in preparations with carcinoembryonic antigen activity. J.Exp.Med. 136: 200 (1972)

175. TERRY,W.D., P.A.HENKART, J.E.COLIGAN, C.W.TODD: Carcinoembryonic antigen: characterization and clinical applications. Transplant.Rev. 20: 100(1974)

176. THOMPSON,W.G., R.R.GILLIES, H.K.SILVER, J.SHUSTER, S.O.FREEDMAN and P.GOLD: Carcinoembryonic antigen and alpha 1-fetoprotein in ulcerative colitis and regional enteritis. Canad.Med.Ass.J. 110: 775 (1974)

177. THOMSON,D.M.P., J.KRUPEY, S.O.FREEDMAN, P.GOLD: The Radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. Proc.Nat.Acad.Sci. 64: 161 (1969)

178. TODD,C.W., M.L.EGAN, J.T.LAUTENSCHLEGER et J.E.COLIGAN: Dosage, isolement et charactérisation de l'antigène carcinoembryonnaire. Ann.Inst.Past. 122: 841 (1972)

179. TOMITA,J.T., J.W.SAFFORD and A.A.HIRATA: Antibody response to different determinants on carcinoembryonic antigen (CEA). Immunology 26: 291 (1974)

180. TORMEY,D.C., T.P.WAALKES, D.AHMANN, C.W.GEHRKE, R.W. ZUMWATT, J.SNYDER and H.HANSEN: Biological markers in breast carcinoma - incidence of abnormalities of CEA, HCG, three polyamines and three minor nucleosides. Cancer 35: 1095 (1975)

181. TROUPEL,S., S.v.KLEIST, P.BURTIN: Dosage radioimmunologique du CEA et du NCA dans le sérum de nouveau-nés à terme et prématurés. Bull.du cancer 63: 655 (1976)

182. TURBERVILLE,C., D.A.DARCY, D.J.LAURENCE, E.W.JOHNS and A.M.NEVILLE:
Studies on carcinoembryonic antigen (CEA) and a related glycoprotein CCEA-2. Preparation and chemical characterization.
Immunochem. 10: 841 (1973)

183. TURNER,M.D., M.S.KLEINMAN and L.HARWELL:
Studies of colonic carcinoma antigens.
GUT 11: 1065 (1970)

184. TURNER,M.D., T.A.OLIVARES, L.HARWELL and M.S.KLEINMAN:
Further purification of perchlorate-soluble antigens from human colonic carcinomata.
J.Immunol. 108: 1328 (1972)

185. TURNER,M.D., M.S.KLEINMAN and W.THAYER:
Serum carcinoembryonic antigen (CEA) in patients with inflammatory bowel disease.
Digestion 9: 116 (1973)

186. VINCENT,R.G. and T.M.CHU:
Carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma of the lung.
J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 66: 320 (1973)

187. WEHRLI,U. et A.E.GASSMANN:
Evolution du titre de l'antigène carcinoembryonnaire après traitement opératoire de tumeurs malignes.
Med. et Hyg. 32: 1151 (1974)

188. WEICHSELBAUM,T.E.:
An accurate and rapid method for the determination of protein in small amounts of blood serum and plasma.
Am.J.Clin.Path. 10: 40 (1946)

189. WU,J.T., A.MADSEN, P.F.BRAY:
Quantitative measurement and chromatography of human urinary carcinoembryonic antigen activity.
J.Nat.Cancer Inst. 53: 1589 (1974)

190. ZAMCHEK,N., T.L.MOORE, P.DHAR, H.KUPCHIK and J.J.SOROKIN:
Carcinoembryonic antigen in benign and malignant diseases of the digestive tract.
Natl.Cancer Inst.Monogr. 35: 433 (1972)

191. ZAMCHEK,N.:
Carcinoembryonic antigen. Quantitative variation in circulating levels in benign and malignant diseases.
Adv.Intern.Med. 19: 413 (1974)

192. ZAMCHEK,N.:
The present status of CEA in diagnosis, prognosis and evaluation in therapy.
Cancer 36: 2460 (1975)

9. LEBENSLAUF

Am 4.11.1951 wurde ich als erstes von zwei Kindern der Eheleute Oberstudiendirektor Dr.Hans Ruider und Johanna Ruider, geb. Hinterseer in Ramsau bei Berchtesgaden geboren. Ich besuchte in München die Volksschule am Winthirplatz und das Wittelsbacher Gymnasium. Nachdem ich dort im Juli 1970 die Reifeprüfung abgelegt hatte, studierte ich an der Universität München vom WS 1970 bis zum SS 1976 Medizin. Am 16.12.1976 bestand ich das Staatsexamen mit der Note sehr gut. 1977 und 1978 arbeitete ich als Medizinalassistent am Städt. Krankenhaus München-Harlaching und am Städt. Krankenhaus Pfaffenhofen.